UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE

ANNÉE 1961 N° 70

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE des NEPHROPATHIES DE L'ENFANT

(Possibilités et limites d'utilisation en microscopie optique des coupes minces préparées pour l'examen électronique)

THÈSE pour le DOCTORAT en MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1961

PAR

JEAN FABRE

ANCIEN INTERNE DES HOPITAUX

ASSISTANT D'ANATOMIE PAPHOLOGIQUE

MEMBRES DU JURY.....

M. SENDRAIL	*Président*
MM. SOREL	*Assesseurs*
MOREL	
PLANQUES	
BOUISSOU	*Suppléant*

Ateliers professionnels et d'apprentissage de l'Orphelinat Saint-Jean, Albi

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546524_0098

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE

ANNÉE 1961 N° 70

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

des

NEPHROPATHIES DE L'ENFANT

(Possibilités et limites d'utilisation en microscopie optique des coupes minces préparées pour l'examen électronique)

THÈSE pour le DOCTORAT en MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1961

PAR

JEAN FABRE

ANCIEN INTERNE DES HOPITAUX

ASSISTANT D'ANATOMIE PAPHOLOGIQUE

MEMBRES DU JURY.....

M. SENDRAIL	*Président*
MM. SOREL	*Assesseurs*
MOREL	
PLANQUES	
BOUISSOU	*Suppléant*

Ateliers professionnels et d'apprentissage de l'Orphelinat Saint-Jean, Albi

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN ..... M. LAZORTHES
ASSESSEUR ..... M. DELAS
Doyens honoraires :
MM. GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER

Professeurs honoraires :
MM. RIBAUT, VALLOIS, CLERMONT, NANTA, DUCUING, TAPIE

SECTION MÉDECINE

PROFESSEURS

	MM.
Clinique médicale	MERIEL
Clinique médicale	GADRAT
Clinique chirurgicale et gynécologie.	FABRE (P.)
Clinique chirurgicale et du Cancer..	GRIMOUD
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie	VIRENQUE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	BAZEX
Clinique des maladies de la Tuberculose et pathologie interne	MOREL
Clinique des maladies des voies urinaires	LIIEZ
Clinique médicale infantile et Puériculture	SOREL
Clinique de Neurologie et Psychiatrie.	RISER
Clinique obstétricale	GUILHEM
Clinique odonto-stomatologique	CADENAT (E.)
Clinique ophtalmologique	CALMETTES
Clinique O.R.L. et de chirurgie maxillo-faciale	CALVET
Clinique traumatologique des membres	RIEUNAU
Accouchement et Obstétricie sociale.	PONTONNIER
Anatomie	LAZORTHES
Anatomie appliquée	POULHES
Anatomie pathologique	FABRE (J.)
Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale	ANDRIEU
Chimie biologique	VALDIGUIE
Electro-Radiologie	MARQUES
Embryologie générale	BROUSSY
Histologie	BIMES
Hydrologie thérapeutique et climatologie	DARNAUD
Médecine légale et du travail	PLANQUES
Médecine sociale	BOUNHOURE
Parasitologie	BOUISSET
Pathologie chirurgicale	DAMBRIN
Pathologie générale et Médecine expérimentale	SENDRAIL
Physico-Chimie	AUVERGNAT
Physiologie	SOULA
Physiologie appliquée et Pharmacologie	BAISSET
Physique biologique et médicale	BUGNARD
Propédeutique médicale	GERAUD
Thérapeutique	DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée	COULOUMA
Pathologie médicale	LAPORTE (J.)
Bactériologie	Mme ENJALBERT

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Physiologie	LAPORTE (Y.)
Biochimie médicale	DOUSTE-BLAZY
Physique médicale	BRU

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie pathologique	BOUISSOU
Histologie et embryologie	PLANEL
Parasitologie	RUFFIE (J.)
Physiologie	MONTASTRUC

AGREGES

Pathologie médicale	MONNIER RIBAUT DELAUDE
Pathologie chirurgicale	CALAZEL ENJALBERT FICAT PASQUIE SOUQUET
Médecine légale	GREZES-RUEF
Odontostomatologie	CADENAT H.
Pediatrie	BARDIER
Rhumatologie	RUFFIE (R.)

AGREGES LIBRES

Anatomie	THOMAS
Ophtalmologie	DEODATTI
O.R.L.	CLAUX
Pathologie chirurgicale	DIEULAFE

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et cryptogamie.	Mme DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène industrielle	BOURBON
Chimie pharmaceutique	BLANC
Histoire naturelle	DELAS
Matière médicale	VINCENT
Pharmacie chimique et pharmacodynamie	CAUJOLLE
Pharmacie galénique	STANISLAS

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie	COUTURIER

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Sciences naturelles	Mlle MEYNIER M. ROUX

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Microbiologie	BREUILLAUD
Sciences physiques	PITET

PERSONNEL ADMINISTRATIF : Secrétaire principal : ROCHE — Secrétaire : Mme LAFFONT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération du 12 mai 1891)

R.U.M.V.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MA FEMME

A MA FILLE

A MON PÈRE

A MON MAITRE

avec toute mon affection filiale.

A MA MÈRE

A MA BELLE-FAMILLE

A TOUS MES PARENTS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR MARCEL SENDRAIL

Professeur de Pathologie générale et de Médecine expérimentale,
Membre correspondant de l'Académie nationale de Médecine,
Secrétaire perpétuel de l'Académie des Jeux Floraux,
Officier de la Légion d'Honneur

Il nous a fait le très grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse ; nous sommes fier de montrer ainsi notre attachement à l'humanisme médical qu'il incarne de façon éclatante.

A NOTRE JURY DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR RAYMOND SOREL

Professeur de Clinique médicale infantile et de Puériculture,
Chevalier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR LOUIS MOREL

Professeur de Clinique des maladies de la Tuberculose
et de Pathologie interne,
Chevalier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN PLANQUES

Professeur de Médecine légale et de Médecine du travail,
Médecin des Hôpitaux,
Chevalier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR HUBERT BOUISSOU

Maître de Conférences agrégé à la Faculté,
Assistant des Hôpitaux

A tous vont nos remerciements pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger notre travail inaugural, pour l'enseignement et les exemples de droiture que nous avons reçus d'eux et notre reconnaissance pour l'amitié, souvent courageuse, qu'ils n'ont cessé de nous témoigner.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GASTON DUPOUY

Membre de l'Institut,
Directeur général honoraire du C.N.R.S.,
Directeur du Laboratoire national d'Optique électronique du C.N.R.S.,
Doyen honoraire de la Faculté des Sciences de Toulouse,
Commandeur de la Légion d'Honneur

dont la haute bienveillance a permis la réalisation de ce travail.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LOUIS FRÜHLING

Directeur de l'Institut d'Anatomie Pathologique de Strasbourg

Avec toute notre reconnaissance pour tout ce que nous avons retiré de notre séjour dans son Institut.

A NOS MAITRES DE LA FACULTÉ ET DES HOPITAUX

A NOS CAMARADES DE L'INTERNAT

MEIS ET AMICIS

AVANT-PROPOS

Ce travail n'est qu'un élément des recherches poursuivies depuis plusieurs années, sur la pathologie rénale, dans le Service d'Anatomie pathologique du Professeur Jacques Fabre et la Clinique médicale infantile du Professeur Raymond Sorel.

L'expérience et l'enthousiasme du Professeur Hubert Bouissou nous ont guidé et encouragé tout au long de sa rédaction. Nous sommes son élève depuis la préparation du concours de l'externat et tenons à lui exprimer publiquement notre reconnaissance pour tout ce que nous lui devons.

Nous tenons à remercier tout particulièrement le docteur Claude Régnier : la richesse de sa documentation, la confrontation anatomo-clinique qu'il poursuit tous les jours, son expérience de la microscopie électronique nous ont été très profitables ; nous souhaitons que notre collaboration reste toujours aussi amicale.

Enfin, il faut signaler la part considérable prise dans l'élaboration de ce travail par nos amis du laboratoire d'Anatomie Pathologique : Madame le docteur Familiadès, Monsieur le Docteur Marc Fievez ont su nous apporter critiques et suggestions ; Monsieur Murat et Mademoiselle Domenc nous ont aidé avec tout leur dévouement.

Nous remercions, par ailleurs, l'équipe de microscopie électronique de l'Institut d'Anatomie Pathologique de Strasbourg qui nous a fourni les premiers éléments techniques de cette étude et Madame Quercy pour sa collaboration efficace pendant la préparation de nos coupes au Centre d'optique électronique du C.N.R.S.

PRÉFACE

Notre dessein n'est pas, dans ce chapitre liminaire, de rappeler d'une manière complète les fortunes diverses qu'a connues l'étude anatomo-pathologique des néphropathies.

Depuis la première description de Bright (1827), les investigations morphologiques et les déductions qu'elles ont permises, ont connu tantôt un vif engouement, tantôt un méprisant dédain.

L'une et l'autre de ces attitudes peuvent, étant donné les conditions d'examen, être parfaitement justifiées.

La recherche du siège d'une maladie, de la cause organique de la mort, est une des bases de la science médicale. Morgagni, dans ses « Lettres », s'appuie continuellement sur ce principe de causalité : à tout syndrome clinique doit correspondre une altération anatomique et inversement. De cette affirmation découlent toutes les tentatives de confrontation anatomo-clinique, de plus en plus complexes, souvent aussi de plus en plus décevantes.

Les discordances entre les constatations cliniques et les données morphologiques se révélèrent, en effet, de plus en plus nombreuses au fur et à mesure que les recherches se multiplièrent. Et Widal, au début de ce siècle, dénie toute valeur, dans l'étude des néphrites, à l'examen anatomo-pathologique, produit de « la plus fossile des sciences mortes ».

Pareil discrédit était mérité, car la recherche anatomo-pathologique et les tentatives de synthèse anatomo-clinique étaient faites suivant une méthode qui ne pouvait donner que des résultats décevants.

Les causes d'erreurs sont, en effet, multiples, et nous rappelons brièvement les principales.

Les descriptions morphologiques, qu'il s'agisse de constatations macroscopiques ou d'examens microscopiques, n'intéressent que des pièces d'autopsie. La lésion est

arrivée à un point de complexité telle que son aspect est banal, impersonnel. Il est impossible, sur les protocoles, bilan de faillite de la fonction rénale, de rechercher l'antériorité de l'atteinte parenchymateuse ou conjonctive. Les discussions qui opposent les diverses écoles sont vaines et pur jeu de l'esprit. Comment, dans ces lésions toutes faites, trouver l'image et les moments de la lésion se faisant ? Et, sur ces pièces, peut-on faire le départ entre lésions et altérations cadavériques ? Rathery (72) s'était attaché, il y a plus d'un demi-siècle, à ce travail de discrimination.

Une autre cause d'erreur n'est pas d'ordre morphologique mais biologique. Les notions sur la physiologie normale du rein étaient trop simplistes et trop incomplètes, pour que tout essai de synthèse anatomo-clinique ne dût paraître prématuré ou présomptueux. Il n'est pas bon de poser des conclusions en s'appuyant sur des hypothèses. Le divorce entre l'anatomie pathologique et la clinique des néphropathies paraissait inévitable. Renonçant à toute base morphologique et lésionnelle, les cliniciens, en notre pays, classent les néphrites en fonction de leur évolutivité (Brault) ou de leur symptomatologie (Castaigne, Widal), sans beaucoup se soucier des lésions que l'autopsie révèlera, éléments de nosologie néanmoins indispensables.

Cependant, en d'autres pays, d'autres écoles poursuivaient l'étude des lésions. En 1924, Oberling (64), s'appuyant sur les recherches biopsiques d'Aschoff, de Fahr, de Volhard (82), rappelle que le rein, unité organique pour un anatomiste, est une combinaison de tissus, ayant chacun leur physiologie et, partant leur spécificité lésionnelle. L'atteinte primitive est, non plus globale, mais tissulaire. Glomérules, vaisseaux, tissu interstitiel traduisent leurs lésions par des signes cliniques différents, souvent discrets et perdus dans la mémoire du malade, lorsque au bout d'années, s'installe le tableau touffu de la grande insuffisance rénale.

L'auteur strasbourgeois précisait ainsi les avenues du Mal de Bright. Les tubulopathies, par contre, ont une individualité très marquée et n'aboutissent qu'exceptionnellement à un vrai Mal de Bright.

Parallèlement à ces acquisitions d'ordre morphologique, les physiologistes et les biologistes apportaient des notions nouvelles sur la physiologie du néphron. Glomérule et

tube voient leur rôle précisé, tandis que sont mis en évidence les facteurs extra-rénaux de certains symptômes classiquement attribués jusque là au seul déficit rénal.

Ainsi s'est progressivement modifié le tableau primitivement tracé, et les recherches actuelles apportent leur contingent non négligeable de faits nouveaux. Le perfectionnement des techniques des épreuves fonctionnelles, l'étude des clearances font mieux apprécier, dès les stades de début, le degré de déficit fonctionnel du glomérule ou du tubule. Plus récemment encore, la pratique de la ponction rénale per-cutanée établit par des prélèvements, l'histogénèse des néphropathies, étudiant ainsi la lésion se faisant, au lieu de se borner à décrire la lésion toute faite.

A cet ensemble si riche d'acquisitions, qui permet de confronter à nouveau penser anatomique et penser biologique, sont venues s'ajouter les données de la microscopie électronique. Les thèses inaugurales de Putois (71), de Régnier (73), de Combes (28), ont apporté une importante contribution aux travaux des électroniciens français.

La richesse de la moisson qu'ils ont faite ne doit cependant pas nous faire sous-estimer les difficultés qui hérissent l'observation électronique. Un travail, non de dénigrement ou de refus systématique, mais de critique et de comparaison, reste indispensable. Les ordres de grossissement sont tels qu'il est difficile d'avoir une vision d'ensemble de la préparation et de replacer les images cytologiques dans le contexte tissulaire. Les artefacts sont probablement nombreux et beaucoup sont encore à préciser.

C'est dans cet esprit de critique et d'objectivité que Bouissou et Régnier (18, 19) ont étudié parallèlement données de la microscopie classique et données de la microscopie électronique. Ils ont constaté quelques divergences. C'est pour essayer de les comprendre et pour compléter, si cela est possible, les données acquises, que nous avons entrepris, suivant les méthodes de la microscopie optique, l'étude de biopsies préparées pour l'examen électronique, fixées à l'acide osmique, incluses au méthacrylate et débitées à l'ultra-microtome en coupes d'une épaisseur moyenne de quatre dixièmes de μ. Nous avons ainsi voulu combler le fossé qui sépare les deux méthodes d'examen, quant à leur ordre de grossissement. Le plus fort grossissement en microscopie optique est de 2.000, le plus faible en microscopie électronique est de 2.500. La minceur des coupes

utilisées permet d'obtenir des images très lisibles aux grossissements les plus puissants utilisés en microscopie optique, sans qu'intervienne ce halo de diffraction qui en rend aléatoire l'usage pour des coupes plus épaisses.

La microscopie électronique donne des images noir et blanc, très riches d'enseignement ,mais souvent difficiles à interpréter. Nous avons voulu pousser plus loin l'analyse lésionnelle par quelques réactions histo-chimiques.

Ce travail n'est qu'un début. Des circonstances extérieures ne nous ont pas permis de pousser plus loin nos recherches. Telles qu'elles sont, nous croyons cependant qu'elles peuvent apporter une modeste contribution à la connaissance plus approfondie des néphrapathies.

Nous ajouterons enfin deux arguments d'ordre pratique. Les préparations que nous avons effectuées suivant notre technique sont stables. Elles peuvent être conservées, reprises, comparées, tandis que, seul, un cliché reste de la préparation électronique.

Les renseignements obtenus ne nécessitent pas l'outillage coûteux de la microscopie électronique. Un ultramicrotome suffit. De nombreux laboratoires pourront ainsi préparer à l'examen électronique des chercheurs qui, ayant acquis de solides bases anatomo-pathologiques, pourront utiliser avec profit les possibilités presque illimitées que nous offre l'étude au microscope électronique.

PLAN

PREMIERE PARTIE

Etude critique des étapes antérieures à l'examen histologique

CHAPITRE I. — *La fixation.*

a) Action sur les protéines.
b) Action sur les autres composants cellulaires.

CHAPITRE II. — *Les autres étapes de la technique histologique.*

a) Déshydratation.
b) Inclusion.
c) Coupe.

CONCLUSION.

DEUXIEME PARTIE

Les procédés d'examen

CHAPITRE I. — *Examen sans préparation : contraste de phase.*

CHAPITRE II. — *Colorations histologiques.*

CHAPITRE III. — *Possibilités histochimiques.*

CHAPITRE IV. — *Techniques personnelles.*

TROISIEME PARTIE

Résultats

CHAPITRE I. — *Histologie du rein normal.*

a) Rappel des connaissances actuelles.
b) Contribution personnelle.

CHAPITRE II. — *Anatomie pathologique des Glomérulopathies de l'enfant.*

a) Etude analytique des lésions.
b) Groupements lésionnels.
c) Commentaires.

CONCLUSIONS.

Pour cette étude, nous avons utilisé les nombreuses biopsies rénales pratiquées dans le Service de notre maître, le professeur Raymond Sorel ; elles ont déjà fait l'objet des thèses inaugurales des docteurs Dupont (17), Régnier (73), Monteil (60). Nous avons repris la partie du prélèvement qui avait été réservée à la microscopie électronique ; il avait donc subi la préparation de routine suivante :

— fixation dès le prélèvement pendant une heure avec une solution d'acide osmique à 1 %, tamponné selon la formule de Palade ;

— après un rinçage à l'eau distillée, la déshydratation s'effectue à l'alcool absolu dans l'appareil de Bernhard ; sa durée est d'une heure ;

— l'inclusion est faite selon la technique de Borysko dans le méthacrylate de butyle prépolymérisé.

Pour la confection des coupes, nous avons employé l'ultra-microtome de Porter-Blum, avec couteaux de verre.

Nous avons pratiqué systématiquement des coupes de deux épaisseurs différentes :

d'une part, en employant le mouvement micrométrique propre de l'appareil, réglé sur l'épaisseur maxima, nous avons réalisé des coupes de 0,4 μ ; c'est du moins leur épaisseur théorique ; elles présentent en lumière incidente une teinte irisée vert et rouge.

d'autre part, en tournant, avant chaque passage du bloc, d'un vingtième de tour environ, la vis d'avance lente du rasoir, nous obtenons des coupes de 1,5 à 2 μ.

Quelle que soit leur épaisseur, les coupes sont recueillies à la surface d'une cuvette remplie d'eau acétonique et fixée sur le couteau ; elles se déplissent légèrement, puis sont transportées par une anse de platine de bactériologie dans une goutte d'eau albumineuse déposée sur une lame porte-objet. Nous vérifions à la loupe binoculaire leur disposition et l'absence de plis trop importants, que nous tentons de supprimer. Chaque lame porte 3 ou 4 coupes successives et nous préparons 5 ou 6 lames de chaque bloc :

ceci permet, sinon une reconstitution par coupes sériées, du moins le recoupement de détails sur des prélèvements différents. Lorsque leur disposition sur la lame est correcte, nous achevons l'expansion des coupes, soit par l'action de vapeurs de chloroforme, soit en chauffant légèrement la lame au-dessus d'un bec Bunsen.

Les vapeurs de chloroforme permettent de surveiller à la loupe l'expansion des coupes ; elles sont cependant plus brutales et doivent être employées modérément ; la chaleur agit plus régulièrement si l'on prend la précaution de mettre sur la lame assez d'eau albumineuse.

Une fois le fragment étalé, la lame est épongée avec précaution au papier filtre et séchée une nuit à 37°.

Une telle méthode d'inclusion, de coupe est très classique et nous ne nous y arrêterons pas. Mais nous croyons indispensable d'envisager l'influence des diverses étapes de la technique suivie, prévue pour la microscopie électronique, sur les possibilités d'examen en microscopie optique : ce sera l'objet de notre première partie.

Nous indiquerons dans une deuxième partie les différents procédés d'examen utilisables et nos techniques personnelles.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE CRITIQUE DES ÉTAPES ANTÉRIEURES A L'EXAMEN HISTOLOGIQUE

CHAPITRE I

La Fixation

Action sur les proteines

Il est logique de l'envisager en premier lieu, car la fixation est essentiellement une modification des protéines formant la charpente cellulaire et la rendant résistante aux différentes manœuvres histologiques : déshydratation, inclusion, coupe, bombardement électronique.

Rappelons d'ailleurs que la notion de fixation est relative, fonction de l'ensemble des étapes ultérieures ; ceci est évident si l'on envisage par exemple le cas particulier des inclusion lipidiques : selon la technique de coupe, — congélation ou inclusion à la paraffine, — un fixateur sera efficace ou non.

Si l'acide osmique est un préservateur cytologique parfait, conservant exactement l'aspect vital d'une cellule, il est cependant considéré, assez paradoxalement, comme un mauvais fixateur histologique :

— d'une part, sa pénétration est la plus lente de tous les corps employés dans ce but : une solution aqueuse à 2 % d'acide osmique ne fixe que 290 μ de parenchyme hépatique en un heure (Tellysniczky) (10). Rhodin, plus récemment, note que des lésions d'autolyse apparaissent après 5 minutes et que pendant ce laps de temps, la solution osmiée fixe 40 μ de tissu (74).

— d'autre part, la fixation osmique était défectueuse, envisagée dans la succession des étapes histologiques habituelles : elle donne des fragments tissulaires friables, incapables de résister à la brutalité de l'inclusion à la paraffine.

Ces deux inconvénients n'existent pas dans notre étude, puisque les fragments prélevés par ponction sont d'une taille très réduite et que l'inclusion se fait dans le méthacrylate. D'ailleurs, l'expérience de la microscopie électronique indique surabondamment la qualité irremplaçable

de la fixation osmiée, au moins dans la zone intermédiaire du bloc, entre un centre présentant souvent des signes d'autolyse et une périphérie surfixée.

Cependant notre ignorance est encore grande sur son mécanisme exact, que nous allons tenter de saisir.

1° Les tests « in vitro » montrent que l'acide osmique conserve la structure d'un gel protéique, le rendant insoluble dans l'eau tiède ; une solution d'ovalbumine est rendue plus visqueuse, passant de l'état de sol à celui de gel, mais cette stabilisation ne s'accompagne pas de coagulation (10).

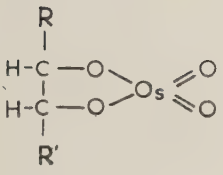
On peut considérer la coagulation comme une floculation irréversible du gel protéique. Celui-ci présente normalement une imbibition considérable d'eau, résistant même à de fortes pressions ; chaque molécule est ainsi entourée d'une gaîne de molécules d'eau qu'enlève la coagulation en provoquant l'image microscopique d'un réseau plus ou moins fin, suivant la brutalité de son action ; les mailles de ce dernier ne représentent pas directement les chaînes scléroprotéiques, mais traduisent leur rapprochement en unités plus volumineuses, rapprochement rendu possible par la fuite de l'eau les entourant.

Fixateur non coagulant, le tétroxyde d'osmium ne modifie donc pas l'hydrophilie des chaînes protidiques et cette absence de coagulation explique les bons résultats de la fixation osmiée, même au niveau des ultrastructures ; elle explique aussi l'insuffisance relative de cette fixation : Bahr (6, 7) a montré que l'extraction aqueuse par ébullition enlève 60 % du matériel fixé pendant 4 heures ; Dallam (31), sans employer des procédés aussi énergiques, évalue à 15 % la perte protidique dans trois rinçages à l'eau distillée après le même temps de fixation ; les temps suivants de la technique stoppent cette fuite.

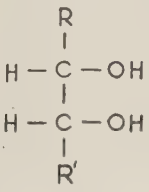
2° Ne pouvant expliquer la fixation osmiée par une coagulation, comme celle qu'entraîne la chaleur, ou l'acide picrique, pouvons-nous l'expliquer par une addition ? Dans ce cas, il y aurait combinaison de la molécule d'Osmium avec les molécules organiques, assurant leur stabilité.

Cela est tentant lorsqu'on connaît les propriétés chimiques des solutions d'acide osmique. Leur action oxydante sur les liaisons éthyléniques avait été remarquée très tôt ; Hoffmann (41-42) établit ensuite la sensibilité d'autres groupements : alcools, acides aminés. Mais ce sont surtout

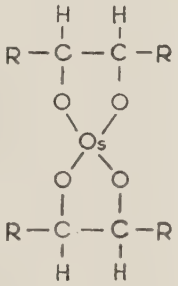
les travaux de Criegee et de son école (29, 30) qui peuvent être invoqués ; ils ont précisé le mécanisme d'oxydation de certains hydrocarbures non saturés (une vingtaine) : il se produit en solution non aqueuse, un ester (I) résultant de la fixation d'une molécule d'acide osmique sur la double liaison ; l'hydrolyse, laborieuse, de cet ester libère deux fonctions alcool adjacentes, en position cis (II). Ces esters de Criegee sont cristallisables en combinaison avec la pyridine ; ils peuvent donner un diester où la molécule osmiée est en pont (III).



I



II



III

Ce système d'oxydation sélective des doubles liaisons a été employé en chimie organique, notamment dans l'étude et la synthèse des corticostéroïdes.

Peut-on, par ces esters de Criegee, expliquer la fixation des tissus ? Cela nous semble peu probable :

— d'une part, on n'obtient ces composés d'addition que dans des solutions non polaires : éther, benzène, cyclohexane, et non avec les solutions aqueuses de tétroxyde d'osmium qui sont d'emblée oxydantes (30). Nos mélanges fixateurs ne semblent donc pas, puisqu'ils sont aqueux et agissent sur une substance aqueuse, pouvoir permettre leur formation.

— d'autre part, il semble qu'ils ne se produisent pas avec toutes les doubles liaisons : Criegee n'a utilisé que des hydrocarbures cycliques, et les recherches ultérieures ont mis en évidence la susceptibilité de la zone K de

l'hydrocarbure, bien particulière, puisqu'elle est aussi responsable de leur pouvoir cancérigène (5).

Nous pensons donc, avec Bahr, que la formation d'esters de Criegee, possible uniquement en milieu non aqueux, n'est plausible que dans les inclusions lipidiques. Il est difficile d'admettre, comme Baker (11), que c'est uniquement par action sur les lipides que l'on obtient une fixation aussi parfaite, incomparablement supérieure à celle que donnent d'autres fixateurs des lipides.

3° L'étude analytique des modifications entraînées par la fixation osmiée montre d'ailleurs qu'il y a plus qu'une hydroxylation des liaisons éthyléniques.

Porter et Kalman (70) avaient fait une étude sommaire des modifications apportées par une solution aqueuse d'OsO_4 à diverses substances organiques. Bahr (5) a étendu ces recherches à 120 corps ; il emploie une solution faible, 0,01 M, soit 2 p. 1.000, bien inférieure à celle du mélange de Palade, et ne contrôle pas le pH. Malgré des conditions légèrement différentes de celles de la fixation, on doit, semble-t-il, tenir compte de ses conclusions : il y a, pour une durée de une heure, oxydation des fonctions suivantes : sufhydriles, éthyléniques (aliphatiques et cycliques), amines (tertiaires surtout), hydroxyles, énumérées dans l'ordre de sensibilité décroissante.

Donc il y a oxydation de la plupart des groupements disposés de part et d'autre de la chaîne protéique et caractéristiques des acides aminés comme la cystéine, les acides aminés aromatiques, les bases hexoniques, la proline, la thréonine. On voit là l'action très générale du tétroxyde d'Osmium.

4° Mais il faut, croyons-nous, ne pas négliger l'apparition d'une forme réduite d'OsO_4, se produisant parallèlement à toutes les oxydations énumérées plus haut : c'est un dioxyde, OsO_2.

Alors que OsO_4 est soluble dans l'eau, ce dérivé ne l'est pas : c'est un colloïde très instable, précipitant lorsque le pH est proche de la neutralité, et difficile à déshydrater (Ruff et Rathsburg, 75) ; c'est lui le responsable du brunissage des solutions osmiées (Partington et Hutingford, 69). Sa persistance au sein du tissu est bien établie : Bahr (8) a trouvé, par dosage pondéral, 5 gammas d'Osmium retenu pour 100 gammas de protéine ; Menke (58),

par étude des diagrammes de diffraction électronique, a pu affirmer la présence d'OsO_2 dans des chloroplastes fixés par la solution de Palade. Merriam (59) a étudié son importance par comparaison des images obtenues avant et après son déplacement par l'eau oxygénée. Il précise ainsi son rôle dans la formation de l'image électronique et la résistance des tissus vis-à-vis du bombardement électronique.

Il nous semble donc plausible de faire jouer un rôle dans la fixation à cette production de dioxyde d'Osmium au contact des multiples groupements réducteurs hydrophiles et hydrophobes ; ce dioxyde colloïdal réalise une sorte d'injection dans les interstices des scléroprotéines, ou au contact des lipides insaturés, protégeant leur topographie : mais cette protection est assez brève, car la solution colloïdale vieillit en faisant un précipité grossier (75) et on sait qu'une fixation prolongée, (Low, 54), entraîne une désintégration des images cytoplasmiques (27). Les temps ultérieurs de la fixation, déshydratation, avant tout, empêchent cette évolution.

L'image électronique donnée par cet oxyde d'Osmium serait par conséquent réglée plus par les structures préexistantes, servant de point d'appel, de « germe » à sa précipitation (par un processus analogue à celui se déroulant dans une plaque photographique), que par les groupements oxydables, dont d'ailleurs beaucoup sont libres, en solution dans l'eau intracellulaire, et ne donneraient pas d'image organisée.

Nous avons trouvé sous la plume de Poll (33) une expression évoquant cette fixation particulière : « eine Art von Erstickung », une sorte d'étouffement : tous les interstices submicroscopiques, hydratés ou non, de l'éponge protoplasmique, sont engorgés par la suspension colloïdale de OsO_2, bloquant les échanges et protégeant l'architecture.

Il ne s'agit que d'une hypothèse, suggérée par le comportement des tissus fixés par l'acide osmique, mais qui explique, au moins partiellement, l'originalité de ce mode de fixation.

l'hydrocarbure, bien particulière, puisqu'elle est aussi responsable de leur pouvoir cancérigène (5).

Nous pensons donc, avec Bahr, que la formation d'esters de Criegee, possible uniquement en milieu non aqueux, n'est plausible que dans les inclusions lipidiques. Il est difficile d'admettre, comme Baker (11), que c'est uniquement par action sur les lipides que l'on obtient une fixation aussi parfaite, incomparablement supérieure à celle que donnent d'autres fixateurs des lipides.

3° L'étude analytique des modifications entraînées par la fixation osmiée montre d'ailleurs qu'il y a plus qu'une hydroxylation des liaisons éthyléniques.

Porter et Kalman (70) avaient fait une étude sommaire des modifications apportées par une solution aqueuse d'$Os0_4$ à diverses substances organiques. Bahr (5) a étendu ces recherches à 120 corps ; il emploie une solution faible, 0,01 M, soit 2 p. 1.000, bien inférieure à celle du mélange de Palade, et ne contrôle pas le pH. Malgré des conditions légèrement différentes de celles de la fixation, on doit, semble-t-il, tenir compte de ses conclusions : il y a, pour une durée de une heure, oxydation des fonctions suivantes : sufhydriles, éthyléniques (aliphatiques et cycliques), amines (tertiaires surtout), hydroxyles, énumérées dans l'ordre de sensibilité décroissante.

Donc il y a oxydation de la plupart des groupements disposés de part et d'autre de la chaîne protéique et caractéristiques des acides aminés comme la cystéine, les acides aminés aromatiques, les bases hexoniques, la proline, la thréonine. On voit là l'action très générale du tétroxyde d'Osmium.

4° Mais il faut, croyons-nous, ne pas négliger l'apparition d'une forme réduite d'$Os0_4$, se produisant parallèlement à toutes les oxydations énumérées plus haut : c'est un dioxyde, $Os0_2$.

Alors que $Os0_4$ est soluble dans l'eau, ce dérivé ne l'est pas : c'est un colloïde très instable, précipitant lorsque le pH est proche de la neutralité, et difficile à déshydrater (Ruff et Rathsburg, 75) ; c'est lui le responsable du brunissage des solutions osmiées (Partington et Hutingford, 69). Sa persistance au sein du tissu est bien établie : Bahr (8) a trouvé, par dosage pondéral, 5 gammas d'Osmium retenu pour 100 gammas de protéine ; Menke (58),

par étude des diagrammes de diffraction électronique, a pu affirmer la présence d'OsO_2 dans des chloroplastes fixés par la solution de Palade. Merriam (59) a étudié son importance par comparaison des images obtenues avant et après son déplacement par l'eau oxygénée. Il précise ainsi son rôle dans la formation de l'image électronique et la résistance des tissus vis-à-vis du bombardement électronique.

Il nous semble donc plausible de faire jouer un rôle dans la fixation à cette production de dioxyde d'Osmium au contact des multiples groupements réducteurs hydrophiles et hydrophobes ; ce dioxyde colloïdal réalise une sorte d'injection dans les interstices des scléroprotéines, ou au contact des lipides insaturés, protégeant leur topographie : mais cette protection est assez brève, car la solution colloïdale vieillit en faisant un précipité grossier (75) et on sait qu'une fixation prolongée, (Low, 54), entraîne une désintégration des images cytoplasmiques (27). Les temps ultérieurs de la fixation, déshydratation, avant tout, empêchent cette évolution.

L'image électronique donnée par cet oxyde d'Osmium serait par conséquent réglée plus par les structures préexistantes, servant de point d'appel, de « germe » à sa précipitation (par un processus analogue à celui se déroulant dans une plaque photographique), que par les groupements oxydables, dont d'ailleurs beaucoup sont libres, en solution dans l'eau intracellulaire, et ne donneraient pas d'image organisée.

Nous avons trouvé sous la plume de Poll (33) une expression évoquant cette fixation particulière : « eine Art von Erstickung », une sorte d'étouffement : tous les interstices submicroscopiques, hydratés ou non, de l'éponge protoplasmique, sont engorgés par la suspension colloïdale de OsO_2, bloquant les échanges et protégeant l'architecture.

Il ne s'agit que d'une hypothèse, suggérée par le comportement des tissus fixés par l'acide osmique, mais qui explique, au moins partiellement, l'originalité de ce mode de fixation.

Action sur les autres composants cellulaires

Il nous faut l'indiquer rapidement, car, si elle ne joue pas un grand rôle dans la fixation elle-même, elle est à la base des possibilités de recherches ultérieures.

1° Les *glucides* ne sont pas attaqués et la fixation du cytoplasme les maintient « in situ », empêchant leur diffusion ; cependant signalons que leur caractérisation sera rendue plus difficile comme nous le préciserons plus loin.

2° Les *lipides* sont le siège de deux phénomènes, bien distingués par Starke et Handwerk (10, 33) :

il y a d'abord réduction de OsO_4 par les acides insaturés ou leurs esters ; il s'agit avant tout de l'acide oléique, constituant de triglycérides ou de lipides conjugués, en second lieu d'hydrocarbures non saturés, cycliques ou non (stérols, vitamines) : des esters de Criegee pourraient se former avec les stérides ; les autres lipides non saturés, aliphatiques, sont simplement oxydés avec remplacement des doubles liaisons par des fonctions alcool et précipitation d'OsO_2.

Même saturés, les lipides retiennent en solution le tétroxyde d'Osmium ; cinquante fois plus soluble dans le tétrachlorure de carbone que dans l'eau (10), il a une affinité certaine pour les solvants non polaires, expliquant la coloration histologique de Marchi (1, 2, 3). Les étapes ultérieures de la préparation des blocs retentiront sur cet acide osmique dissous.

3° Les *nucléoprotéines* méritent une mention particulière : elles ne sont pas coagulées et ne forment pas d'image chromatinienne : elles sont conservées « in situ », mais leur aspect homogène donne aux noyaux une structure compacte où seul le nucléole est visible ; cette fixation particulière des noyaux donne aux préparations un aspect caractéristique.

CHAPITRE II

Les autres étapes de la technique histologique

Déshydratation

Son action sur les tissus est importante à divers points de vue :

— d'une part, elle complète la fixation ; elle empêche avant tout une remobilisation du précipité colloïdal d'OsO_2 ; celui-ci modifie à son tour considérablement l'action fixatrice propre de l'éthanol, qui est une coagulation, en la rendant macroscopiquement indiscernable (10).

— d'autre part, si l'alcool éthylique ne modifie pas les glucides, son action sur les lipides est importante : il en dissout une partie, surtout les lipides insaturés ; de plus, il réduit le tétroxyde, dissous dans les inclusions lipidiques ou lipido-protidiques et ayant résisté au rinçage effectué après la fixation. Il se produit alors un noircissement secondaire des inclusions lipidiques, défini avec précision par Starke et utilisé par les anciens histologistes comme coloration des graisses.

De cette double action : dissolution et précipitation, résultent des images décrites comme « Ringkörner » par Altmann : cercles ou croissants noirs, entourant une vacuole ou l'occupant partiellement : de telles images sont fréquentes sur les micrographies électroniques ; elles indiquent la présence de lipides, mais seul, le noircissement primaire est en faveur de leur caractère insaturé ; notons enfin que ce précipité osmié ne protège que partiellement d'une dissolution par l'alcool. Indiquons en terminant que cette déshydratation n'entraîne qu'une rétraction légère du fragment tissulaire, très inférieure à celle produite habituellement, qui est de 20 % après une fixation formolée (9).

Inclusion

Elle peut provoquer des artéfacts : une polymérisation trop brutale entraîne des fissures dans le bloc, faciles à reconnaître et atténuées par l'emploi de méthacrylate prépolymérisé. Il faut savoir que c'est là un milieu d'inclusion bien supérieur à la paraffine : le défaut majeur de celle-ci, toléré ou ignoré par beaucoup, est d'entraîner une diminution de volume du fragment inclus ; cette rétraction, variable suivant le fixateur utilisé, peut être de 40 % du volume initial ; ceci entraîne une condensation des constituants cytoplasmiques, rendant leur indîvidualisation plus difficile.

Au contraire, le méthacrylate n'entraîne pas de changements de volume et les mesures de Bahr (9) montrent que le fragment inclus a le même volume que lors du prélèvement, la légère rétraction de la déshydratation étant compensée par le gonflement produit par la solution osmique, hypotonique dans le cas de la solution de Palade (68).

Donc, l'inclusion au méthacrylate est un facteur supplémentaire de la fidélité des images obtenues en microscopie électronique ou optique.

Coupe

Nous n'insisterons pas sur ce point, car les coupes semi-fines offrent les mêmes artéfacts de compression que les coupes fines ; ils sont facilement reconnaissables à la déformation parallèle des constituants cellulaires ; on les atténue par divers procédés : vapeur de chloroforme (78) ou expansion thermique, plus régulière d'après notre expérience.

Conclusions

De cette analyse rapide des diverses étapes de la fixation, nous pouvons retirer quelques conclusions :

— La fixation osmique conserve parfaitement la disposition des molécules protidiques, mais diminue considérablement leur réactivité, par oxydation des groupements réactionnels.

— A cette destruction s'ajoute la formation d'un précipité de dioxyde d'Osmium jouant un rôle considérable dans la formation de l'image électronique et la préservation des structures fines ; sa topographie les soulignera en étant commandée plus par des phénomènes d'adsorption que par des combinaisons chimiques.

— La fixation osmique entraîne, en outre, des modifications variables des divers constituants cellulaires ; nous les envisagerons plus en détail à propos des recherches histochimiques.

— La déshydratation alcoolique ne provoque qu'une rétraction minime et entraîne un noircissement secondaire des lipides.

— L'inclusion au méthacrylate est très supérieure à la paraffine pour des fragments de petite taille : elle ne modifie pas leur volume et permet d'obtenir des coupes d'épaisseurs très variées.

Ayant ainsi envisagé les modifications provoquées par la technique de fixation, d'inclusion et de coupe, il nous faut étudier maintenant leur retentissement sur les étapes ultérieures, coloration et examen.

DEUXIÈME PARTIE

LES PROCÉDÉS D'EXAMEN

CHAPITRE I

Examen sans préparation : contraste de phase

L'examen des coupes préparées selon la méthode que nous avons indiquée est possible sans coloration aucune.

On peut, avec un microscope ordinaire, distinguer ses constituants : tubes, glomérules, vaisseaux ; ainsi sont écartés rapidement les blocs sans intérêt.

Mais cette méthode sommaire n'a qu'une valeur de tri ; elle ne permet pas une recherche histologique ; l'acide osmique cependant, a coloré la préparation, mettant en évidence les graisses, les globules rouges, les fibres conjonctives et les membranes cellulaires. Mais la fixation trop brève et la minceur des préparations rendent ce contraste insuffisant, surtout aux forts grossissements.

Si la microscopie habituelle est insuffisante, la microscopie de contraste de phase est très applicable (67, 79, 88). On sait que l'image qu'elle donne traduit une différence d'indice de réfraction (n) ou d'épaisseur (e), donc une différence de chemin optique $n \times e$.

L'épaisseur des coupes est constante, au moins en principe ; les variations d'épaisseur sont dues aux stries du rasoir, mais elles sont très estompées par le milieu de montage.

Nous pouvons donc considérer que la microscopie en contraste de phase rendra visible des différences d'indice de réfraction. Celui des cellules fixées par congélation-dessiccation est de 1,53 (10) ; par contre, celui du matériel osmié serait, d'après les mesures de Merriam, plus élevé : 1,56 à 1,63 (59). Ces chiffres sont déterminés en recherchant le milieu de montage affaiblissant le plus l'image, et donc d'indice semblable à celui de la cellule. Ceci indique l'importance considérable jouée par le milieu d'observation.

Deux possibilités s'offrent à nous :

1° On peut d'abord utiliser la coupe telle qu'elle est : le méthacrylate polymérisé a un indice n = 1,50-52 (67, 79), donc peu différent de celui du baume ou de l'huile à immersion. Il est très facile dans ces conditions, après un examen au faible grossissement, d'employer un objectif à immersion directement sur la lame, comme s'il s'agissait d'un frottis sanguin.

Le montage sous lamelle au baume du Canada permet de faire des préparation permanentes présentant le même contraste. On a ainsi une possibilité d'examen rapide mais assez délicate, car le contraste est faible, bien appréciable uniquement sur un cliché photographique ; nous employons pour cela un film à grain très fin et des temps de pose longs.

2° Il est possible d'augmenter le contraste en remplaçant le méthacrylate par un milieu d'indice plus faible ; cela demande d'abord une dissolution du méthacrylate par un bain de chloroforme de 15 minutes, une réhydratation de la coupe, et enfin un montage dans la glycérine (n = 1,46), ou même l'eau distillée (n = 1,33).

Il faut effectuer très lentement et très soigneusement le changement de solvant par l'emploi de bains d'alcools de degré différents ; une réhydratation trop rapide, peu gênante au faible grossissement, donne avec les objectifs plus forts, une image faussée par un double contour de tous les éléments, traduisant la persistance d'un mince film de chloroforme.

Churg et Grishman (23), au contraire, emploient un milieu de montage d'indice élevé. Les clichés illustrant leur article montrent des images très comparables au nôtre, mais ils examinent un matériel fixé au formol et inclus dans la paraffine.

Ces préparations en phase aqueuse ont un constraste plus marqué ; leur conservation est aléatoire, même après lutage de la lamelle, par action progressive de l'eau sur les structures cellulaires. Enfin les manœuvres de désinclusion ne sont pas toujours bien supportées par les coupes les plus minces.

L'examen de préparations au contraste de phase exige des conditions particulières de netteté : toute poussière, même sur la face postérieure de la lame, toute bulle

microscopique dans l'huile à immersion, donne des franges interférentielles diminuant la netteté de l'image.

L'avantage de l'emploi de coupes semi-fines est cependant l'utilisation complète du pouvoir résolvant de l'objectif : en effet, un objectif à immersion d'ouverture numérique de 1,30 a une profondeur de champ de 0,3 μ en moyenne. Les couches sus et sous jacentes obscurcissent donc l'image si la coupe est plus épaisse que 0,3 μ.

L'aspect des préparations est tout à fait comparable à celui que donne la microscopie électronique à un faible grossissement, sans être gêné par la grille porte-objet.

Les limites nucléaires se voient nettement, ainsi que le nucléole, par contre la chromatine n'a aucun aspect propre et n'est pas distinguable ; les limites cellulaires sont nettes : dans le cytoplasme des cellules tubulaires, on distingue bien des vacuoles plus claires avec des granulations plus denses, parfois des mitochondries en stries basales.

Le glomérule est plus difficile à étudier, car son dessin très serré amène un recoupement des rayons lumineux diffractés et donc un certain flou ; de plus, il subit souvent des distorsions au moment de l'étalement de la coupe sur la lame.

Comme en microscopie électronique, seule la morphologie peut être étudiée, sans identification des constituants cellulaires par leurs diverses affinités tinctoriales ou par leur nature chimique.

C'est donc une méthode simple de familiarisation avec l'image électronique et de recoupement plus sûr des données morphologiques, en raccordant le grossissement de loupe à celui des ultrastructures. Nous réservons donc cette méthode à un contrôle des images obtenues après coloration, puisqu'elle permet de voir le tissu sans aucune modification, tel qu'il est soumis à la microscopie électronique ; mais l'application des colorations permet un examen beaucoup plus aisé.

CHAPITRE II

Colorations histologiques

Comme nous l'avons vu en conclusion de notre première partie, les fragments collés sur nos lames représentent un tissu, d'une part ayant subi des modifications chimiques, et d'autre part intimement pénétré par une suspension colloïdale de dioxyde d'Osmium. Ces deux particularités vont modifier profondément ses affinités tinctoriales. Ceci avait été noté il y a longtemps par les anciens histologistes.

A cette première difficulté, liée à la fixation, s'ajoute celle de la minceur des préparations, diminuant automatiquement l'intensité de la coloration.

Nous allons rappeler les différentes techniques jusqu'ici proposées pour la coloration des coupes semi-fines en les divisant en deux groupes : le premier comprendra toutes celles ne déplaçant pas au préalable le dioxyde d'Osmium ; dans les autres, seront groupées les méthodes comprenant comme premier temps, le déplacement de ce dépôt.

— Houck et Dempsey (43), les premiers, indiquent la possibilité de coloration après dissolution du méthacrylate par le xylène ; ils appliquent les techniques classiques : ils notent comme colorations satisfaisantes celles par l'hématoxyline, par la technique d'Hotchkiss Mac Manus, par celle de Verhoeff pour les fibres élastiques. Mais ils insistent sur la grande variabilité des résultats.

— Runge et Vernier (76) estiment ces résultats insuffisants et adaptent la méthode d'Einarson (coloration nucléaire par la gallocyanine-chrome) ; ils emploient comme coloration de fond une solution de phloxine calcique à chaud, et dissolvent le méthacrylate par un bain de toluène.

— Bencosme et collaborateurs (14) indiquent l'efficacité d'une coloration rapide par une solution de Bleu de Toluidine à 2 %, l'effet métachromatique du colorant

augmentant le contraste ; cette coloration ne nécessite pas une dissolution du méthacrylate.

— Jenning, Farquhar et collaborateurs (44), après dissolution du méthacrylate par un bain de xylène, emploient en coloration de routine, une fuchsine basique comme colorant cytoplasmique.

Ils emploient également les diverses colorations histologiques classiques en les modifiant parfois de manière considérable : ils conseillent d'omettre la différenciation phosphotungstique dans la coloration trichrome de Masson. Des coupes épaisses (4-6 μ) leur semblent indispensables pour la plupart de leurs techniques.

— Enfin Moore et collaborateurs (61) ont récemment proposé une méthode utilisant, après dissolution du méthacrylate par l'acétone, des solutions saturées de cristal violet et de fuchsine basique, sans déshydratation ultérieure ; ils rendraient visibles des coupes de 200 Angströms, soit 0,02 μ.

Devant les difficultés de coloration déjà signalées par les histologistes classiques, certains ont jugé préférable de déplacer le précipité osmique, ou d'employer une manœuvre de blanchiment ayant cet effet.

Ainsi de Harven (40), après dissolution du méthacrylate par le benzène, emploie une solution de periodate à 1 % pendant 15 minutes avant toute coloration.

De même Lacy (50), pour différencier les cellules langerhansiennes, déplace le dioxyde d'Osmium par un bain de periodate et emploie ensuite avec succès une coloration combinée par la fuchsine paraldéhyde de Gomori, l'orange G et le vert Lumière.

On peut utiliser également du peroxyde d'hydrogène en solution concentrée alcoolique (40) ou aqueuse acidifiée ; c'est la technique employée par exemple par Van Breemen (80) dans son étude de la membrane hyaline pulmonaire.

Telles sont les principales techniques proposées pour colorer les coupes semi-fines.

Tous les auteurs dont nous venons de rappeler brièvement les travaux, cherchaient avant tout un moyen de ramener les images ultrastructurales observées à un cadre histologique déjà connu ; ce sont donc essentiellement des métho-

des de recoupement. Mais, nous semble-t-il, la plupart ont des inconvénients que nous allons envisager rapidement.

Elles ne tiennent généralement pas compte des modifications entraînées par la fixation osmique ; ces modifications sont assez importantes pour changer totalement la signification des colorotions : Jenning et collaborateurs, Moore emploient la fuchsine basique comme colorant du cytoplasme, alors que normalement c'est un colorant nucléaire ; de même on a décrit une coloration trichrome sans intervention d'acide phosphomolybdique, ce qui, en fait, ne permet plus de la considérer comme une coloration de Masson.

La pratique du blanchiment permet de retrouver partiellement les affinités tinctoriales classiques, mais il faut alors considérer l'action propre de l'agent employé. De plus, Barnett (13) a constaté les insuffisances de cette opération qui élimine le précipité osmique, mais ne peut restaurer les groupements chimiques détruits.

On ne peut donc se fier aux colorations histologiques classiques ; elles n'ont pas de valeur caractéristique, mais servent simplement à faciliter l'étude morphologique, et pour cette étude, elles sont souvent superflues : un noyau sera toujours reconnu, même sans coloration spécifique ; n'oublions pas enfin les très grandes possibilités de la microscopie en contraste de phase pour une étude morphologique pure.

Il nous faut envisager maintenant l'emploi de techniques spécifiques, celles de l'histochimie, plus précises dans leur fin et aussi plus sensibles au traitement préalable des tissus.

CHAPITRE III

Possibilités histochimiques

L'analyse du mécanisme de la fixation osmiée nous a permis d'indiquer les principales modifications chimiques subies par les tissus. Nous allons étudier maintenant leur influence sur les réactions histochimiques.

— Toute histochimie enzymatique apparaît impossible : par destruction des groupements réactifs des enzymes (sulfhydriles surtout) ou par étouffement et immobilisation des substrats. Nous n'avons d'ailleurs pas entrepris de recherches à ce sujet et n'avons pas trouvé trace dans la littérature de méthode de détection enzymatique *après* la fixation osmiée.

— L'identification d'une substance par action enzymatique nous semble également très aléatoire ; pour être valable, une telle recherche doit porter sur le tissu frais, car tout fixateur modifie la réactivité du substrat ; Keigler (48) a trouvé ainsi des modifications de sensibilité des spores de Bacillus Cereus à l'action de la pepsine, beaucoup moins active après fixation osmique, qui entraîne une diminution des charges positives.

Nous pensons donc que cette fixation interdit toute étude histochimique dynamique ; par contre, avec certaines restrictions, l'histochimie analytique est possible.

*
* *

L'étude des constituants minéraux insolubles est possible : nous avons pu ainsi retrouver des cristaux d'oxalate de calcium dans une ponction biopsie de néphropathie

congénitale ; ce fut le seul cas de pathologie rénale infantile où se soit posé un tel problème ; nul doute que d'autres recherches ne soient possibles sur d'autres tissus.

*
* *

Nous avons vu l'absence de modification des glucides. Signalons toutefois que Wolman (85) aurait trouvé une oxydation des glucosamines, mais en laissant agir la solution osmiée pendant plusieurs jours, ce qui est loin de nos conditions d'utilisation.

Il faut rappeler encore, à la suite de Mac Manus et Mowry (56), la possibilité de fausse positivité du P.A.S. : en effet, l'oxydation des liaisons éthyléniques aboutit à la formation de deux fonctions alcool voisines, donc susceptibles d'être transformées en aldéhyde par le periodate, sans qu'il s'agisse de polysaccharides ; cette création de nouveaux groupements réactifs explique, comme nous l'avons déjà indiqué, la discordance des résultats du P.A.S. suivant la fixation. Malheureusement il est impossible de pratiquer une épreuve de contrôle sur le même fragment puisque le fixateur est en cause : il faut faire une étude comparative sur le même matériel fixé de façon différente.

D'après notre expérience personnelle, les réactions dites des mucopolysaccharides acides : bleu Alcian, fer colloïdal, fuchsine paraldéhyde, métachromasie, perdent toute valeur par suite de la création de nouvelles et multiples fonctions acides (carboxyliques à partir des alcools, sulfoniques à partir des thiols ou même des liaisons disulfures).

Enfin, le glycogène reste bien fixé et identifiable par le test de l'amylase.

*
* *

L'histochimie des lipides est-elle possible ? Nous avons vu que la réduction d'OsO_4 n'était pas imputable exclusivement aux acides gras insaturés : l'osmiophilie n'est donc pas une caractérisation histochimique des lipides ; ainsi la kératine, les grains de zymogène pancréatique sont franchement osmiophiles (33). Rappelons l'existence des noircissements secondaires, venant encore fausser la signification de cette coloration.

Cependant un travail de Chou (22) indique des éléments intéressants : pour lui, la fixation osmiée rendrait les lipides insolubles, et il a pu les mettre en évidence par le noir Soudan, après inclusion à la paraffine ; mais il emploie une fixation osmiée très longue : 24 heures. On ne peut donc appliquer sans réserve ces conclusions au matériel fixé beaucoup moins longtemps, mais elles permettent d'attacher une certaine valeur à la positivité d'une coloration par le noir Soudan, après un blanchiment préalable, qui rendrait leur solubilité particulière aux lipides.

Nous devons ajouter un mot à propos de la réaction de Schmorl, employée dans l'étude des lipo-pigments : elle met en évidence des groupements réducteurs, donc théoriquement très sensibles à l'oxydation osmique ; son éventuelle positivité après une telle fixation est donc peu compréhensible. Mais il faut rappeler le pouvoir réducteur élevé du dioxyde d'osmium, capable de s'oxyder sous l'action de l'oxygène atmosphérique ; c'est donc lui peut-être le responsable de cette réaction.

Par ailleurs, la possibilité d'une post-chromisation a été indiquée par Elftmann (34), après une fixation d'une heure par la solution de Palade ; nous ne croyons pas qu'elle ait été appliquée au matériel fixé pour la microscopie électronique.

*
* *

Comme l'analyse de la fixation nous l'a montré, il y a suppression de la plus grande partie des groupements réactifs fixés latéralement sur la chaîne protidique : celle-ci n'est cependant pas atteinte car il y aurait alors protéolyse et non fixation ; Barnett et Roth (13) ont fait une analyse des possibilités réactionnelles après fixation osmiée : elles sont très diminuées. Ils constatent une augmentation de la basophilie, une suppression totale de l'acidophilie, de la réactivité des groupements aminés et alpha acylamidocarboxyliques, une oxydation des sulfhydriles en acide cystéique ou sulfonique ; si nous rappelons l'affinité d'OsO_4 pour les cycles de la tyrosine ou du tryptophane, les possibilités histochimiques d'analyse protidique apparaissent minimes.

La réaction de Feulgen, par contre, est applicable et donne des résultats satisfaisants : il faut la pratiquer évi-

demment sans blanchiment au periodate qui rendrait les résultats ininterprétables ; on peut cependant utiliser le peroxyde d'hydrogène. De nombreux travaux ont montré la conservation très satisfaisante du D.N.A., soit par cette réaction (53, 62), soit par microscopie dans l'U.V. (35). L'exiguïté des fragments empêche une étude statistique approfondie et rend la photométrie sujette à caution. Enfin, là encore, il faut se méfier des aldéhydes qu'a pu créer la fixation et toujours pratiquer une coloration témoin, en omettant l'hydrolyse chlorhydrique.

*
* *

On ne peut donc considérer la fixation osmiée comme satisfaisante au point de vue histochimique. Elle supprime beaucoup de réactions, fausse le résultat d'autres, demande des tests et des recoupements multiples et ne permet finalement que des conclusions fragmentaires sur la composition tissulaire.

CHAPITRE IV

Techniques personnelles

Malgré ses inconvénients multiples, la fixation osmique est, jusqu'à présent, indispensable pour utiliser pleinement les possibilités de la microscopie électronique, qui a apporté un enrichissement considérable de nos connaissances sur la morphologie des ultra-structures ; il est cependant impossible de faire progresser parallèlement l'étude de leur composition, du moins sur le même prélèvement ; il faudra recourir à des méthodes particulières :

— soit étudier histochimiquement un matériel identique ayant subi une fixation appropriée : mais la localisation restera dans l'ordre de précision de la microscopie optique, sans véritable progression ;

— soit pratiquer une étude biochimique parallèle ; nous songeons aux méthodes employées dans l'analyse des microsomes ou de l'activité enzymatique du chondriome ; on ajoute alors les possibilités d'erreur de cette étude ;

— soit réaliser la recherche histochimique avant fixation osmique : technique délicate puisque la réaction histochimique ne doit pas perturber les ultra-structures cellulaires ;

— soit enfin remplacer la fixation osmiée par un procédé moins destructeur au point de vue chimique et aussi bon protecteur des formes. Mais cela est-il possible ? On ne peut qu'être frappé par cette différence considérable de fixation, selon l'angle adopté : il y a conservation parfaite, même au niveau des structures macromoléculaires, de l'architecture de la matière vivante, mais disparition presque totale de sa réactivité chimique, ne laissant à nos analyses qu'un cadavre très modifié.

Une vue plus élevée du problème permet de l'expliquer : thermodynamiquement, on peut considérer que la dépense énergétique d'un organisme vivant se retrouve dans le maintien de sa structure dissymétrique ,inexplicable par

le calcul des probabilités, ou les lois générales du monde inanimé ; toute fixation cherche à conserver cette structure, tout en supprimant la vie : elle doit donc s'opposer aux réactions chimiques qui, dans un organisme mort, vont se faire dans le sens d'une dégradation, d'un nivellement des structures : la constatation de lésions d' « autolyse » cinq minutes après le prélèvement montre bien la rapidité de cette dégradation à l'échelle submicroscopique.

Plus un fixateur protège bien l'architecture de la cellule, et plus il doit détruire tous les groupements susceptibles de provoquer sa modification : on comprend ainsi que les bons fixateurs enzymatiques (acétone, alcool) conservent imparfaitement la morphologie cellulaire et ce, même à l'échelle microscopique habituelle.

Il faut considérer à part les méthodes de congélation dessication : il ne s'agit là que d'une préservation, ne tuant pas les tissus, et ne les rendant pas résistants à une autolyse ultérieure.

Quoiqu'il en soit, le fixateur idéal, qui concilierait les inconciliables, est encore à trouver ; mais il nous a paru logique d'utiliser pleinement les possibilités de la fixation osmique en étudiant essentiellement la morphologie des néphropathies de l'enfant, sur des coupes semi-fines. Nous avons donc cherché des méthodes permettant, d'une part, l'examen de coupes semi-fines inférieures à un micron, d'autre part adaptées à une recherche histologique et non à un simple contrôle ; étant donné le matériel que nous examinions, nous nous sommes attachés particulièrement à deux éléments du parenchyme rénal : les membranes basales et le cytoplasme des cellules tubulaires.

Etude des membranes basales

On sait tout le profit retiré par l'histologie, de la coloration dite du P.A.S. Rappelons son principe : l'oxydation periodique transforme les groupements glycol (deux hydroxyles adjacents) en aldéhydes : ceux-ci se combineront avec le réactif de Schiff et prendront une coloration pourpre.

Une adaptation de cette réaction aux coupes minces a été faite par Jones (45), en employant comme réactif des aldéhydes une solution d'argent (argent méthénamine de Gomori) ; la coloration pourpre finale du P.A.S. est alors remplacée par un précipité noir ; Jones, puis Churg et ses collaborateurs ont utilisé très fréquemment cette technique.

Il semblait logique de l'appliquer à notre étude ; cependant, comme l'indiquait d'ailleurs son promoteur (46, 25), ses résultats ne sont pas satisfaisants après la fixation osmique : le floculus glomérulaire est coloré en masse, rendant difficile la distinction de la membrane basale et du cytoplasme des cellules la recouvrant.

De même, le P.A.S. classique ne donne pas une image très nette : nous pensons que l'acide osmique, créant de nouvelles fonctions hydroxyles, contribue au peu de précision de ces images.

Nous avons obtenu des résultats incomparablement supérieurs en utilisant la métachromasie provoquée.

Le principe de cette méthode est dû à Kramer et Windrum (49), reprenant et approfondissant une constatation de Bignardi (10). Sous l'action d'acide sulfurique concentré, les polysaccharides neutres sont transformés en esters sulfuriques et deviennent métachromatiques : on sait que la métachromasie demande une configuration spatiale particulière du substrat chromotrope. Il doit exister entre ses groupements sulfuriques un écartement permettant la polymérisation des molécules de colorant venant s'y fixer (10).

Comme on le voit, cette métachromasie provoquée demande, comme le P.A.S. des fonctions alcool, mais disposées d'une manière particulière, périodique. Ceci explique probablement la netteté frappante de la coloration obtenue.

Voici, d'après notre expérience, la meilleure manière de procéder :

1° Pratiquer pendant 15 minutes la sulfation sur une lame sèche, sans enlever le méthacrylate. Nous employons pour cela un mélange à parties égales d'éther sulfurique et d'acide sulfurique concentré, selon un procédé indiqué par Mowry (63).

2° Egoutter et laver à l'alcool absolu pour éliminer les traces de mélange.

3° Dissoudre le méthacrylate par un bain de chloroforme (15 minutes).

4° Passer en phase aqueuse par un bain d'alcool absolu (5 minutes) et d'alcool à 95° (5 minutes).

5° Solution aqueuse de bleu de toluidine à 1 % pendant 15 minutes.

6° Laver, déshydrater rapidement par l'alcool éthylique ou butylique, monter au baume.

Les résultats sont très satisfaisants : les membranes basales glomérulaires et tubulaires, les inclusions hyalines ou glycogéniques tubulaires, les granulations des cellules juxtaglomérulaires sont violettes ; les hématies sont colorées en bleu vif, orthochromatiquement ; par contre, les noyaux apparaissent peu basophiles et sont d'une teinte verdâtre ; les cytoplasmes sont peu colorés.

On peut renforcer le contraste en utilisant une solution de fuchsine basique : nous avons employé la solution phéniquée de Ziehl ; elle agit très rapidement, réalisant une véritable différenciation en quelques secondes ; on a alors une modification des couleurs : seules, les substances fortement métachromatiques restent colorées en pourpre et tout le reste de la préparation prend des teintes différentes de rose. On obtient aussi une coloration des mitochondries tubulaires.

Nous avons obtenu des images très satisfaisantes, même sur des coupes épaisses seulement de 0,2 micron, en employant une lumière monochromatique de 550 microns de longueur d'onde.. Mais, comme nous l'avons indiqué, une telle minceur n'apporte rien de plus.

Nous pensons apporter avec cette nouvelle méthode, un moyen commode et fidèle d'étudier l'architecture fine des tissus ; elle sera sans doute applicable à d'autres tissus que le parenchyme rénal.

Etude du cytoplasme tubulaire

La métachromasie provoquée, avec surcoloration par la fuchsine ,permet, nous l'avons vu, de reconnaître certains éléments : gouttelettes hyalines, chondriome. Il nous a cependant paru intéressant d'obtenir une image plus superposable à celle que donne la microscopie électronique.

On sait la part considérable jouée par les dérivés osmiques dans la formation de celle-ci, et nous avons tenté une mise en évidence de leur précipitation.

Sur des coupes assez épaisses, de plus de 2 microns, ils donnent au tissu une teinte brune, assez diffuse, sur laquelle tranchent les hématies de teinte plus sombre ou les inclusions lipidiques. Sur des coupes plus fines, il n'y a plus d'image observable sans coloration ou emploi du contraste de phase.

Il fallait donc révéler la présence d'osmium ; une possibilité nous était offerte par l'emploi de tannin ou de

pyrogallol ; cette technique indiquée par Lee (52) et par Kolossov (33), a été reprise récemment par Wigglesworth (83) ; cet auteur fixe et colore en masse des larves d'insectes par ce procédé.

Nous avons donc tenté de renforcer la coloration des tissus par action d'une solution à 10 % de pyrogallol. Mais ceci ne donnait pas encore un contraste suffisant, du moins pour l'examen de coupes fines. Aussi avons-nous tenté de faire réagir le pyrogallol sur une solution argentique et nous avons alors obtenu une coloration très fine et suffisamment intense.

Quel est le mécanisme de cette coloration ? Assurément il ne s'agit pas d'une coloration histochimique ; cependant son mécanisme nous semble dépendre d'éléments plus précis qu'une imprégnation.

Classiquement, on explique la coloration par le tannin ou les polyphénols qu'il contient (acide gallique, pyrogallol) comme une réduction d'un oxyde osmié, présent dans les tissus sous une forme incolore ; ceci par analogie avec l'emploi du pyrogallol comme révélateur photographique ; mais l'alcool de déshydratation a déjà accompli cette réduction et les anciens auteurs avaient noté l'identité des résultats obtenus avec l'alcool ou avec le pyrogallol. Donc la coloration que nous obtenons par action du pyrogallol sur un tissu qui a été déshydraté et où théoriquement tout l'osmium est réduit, est peut-être explicable par un autre mécanisme, celui de la chélation : on entend sous ce nom la formation de complexes métalliques où l'ion métallique est uni à une substance organique par des liaisons de co-valence : les polyphénols, notamment certains dérivés du catéchol, peuvent former de telles combinaisons (10) ; cette hypothèse, purement conjecturale, expliquerait le deuxième temps de notre réaction : là, le pyrogallol agit vraiment comme réducteur de la solution argentique ; nous employons d'ailleurs réactifs et technique indiqués par Masson pour la mise en évidence de la mélanine ou des substances phénoliques argentoréductrices. Il y aurait donc, dans un premier temps, formation par chélation d'un composé pyrogallol + dioxyde d'osmium, réduisant dans un deuxième temps, la solution argentique.

Tel est peut-être le mécanisme intervenant ; voici maintenant le mode opératoire que nous conseillons :

1° Dissoudre le méthacrylate et passer en phase aqueuse,

comme à l'accoutumée ; il faut employer des coupes relativement épaisses : 1 μ, au moins.

2° Traiter pendant 2 à 4 heures par une solution aqueuse à 10 % de pyrogallol, fraîchement préparée. Une telle solution ne peut être utilisée qu'une fois.

3° Laver à l'eau courante, puis distillée.

4° Solution d'argent à 5 % ammoniacal, selon Masson, pendant 15 à 30 minutes.

5° Tonifier par l'or, fixer à l'hyposulfite comme dans une recherche de mélanine.

Les contrôles que nous avons effectués ont, soit omis le bain de pyrogallol, soit éliminé l'osmium par action de periodate ou d'eau oxygénée ; ils ont alors donné des images d'imprégnation des fibres interstitielles, sans coloration des cellules.

On obtient une coloration noire des nucléoles, des membranes nucléaires et cellulaires ; le cytoplasme, le chondriome apparaissent en teintes différentes de gris ; les hématies sont également très sombres.

On peut associer métachromasie provoquée et réduction argentique : il faut alors intercaler le bain de pyrogallol et la réduction argentique entre la sulfation et le bleu de toluidine : on obtient alors une image très nette des membranes et des détails cytoplasmiques très fouillés.

Ces deux colorations, métachromasie provoquée et argento-réduction provoquée, ont été employées tout au long de cette étude et nous ont paru les plus appropriées à l'étude des coupes semi-fines. Nous avons cependant pratiqué d'autres colorations, soit après un bain de periodate (trichrome de Masson, hématoxyline ferrique de Heindenhain, métachromasie, P.A.S.-fer colloïdal, bleu Alcian, Van Gieson, Weigert), soit d'emblée : bleu polychrome, métachromasie, violet de gentiane, violet de méthyle, safranine, etc...

Aucune ne nous a semblé pleinement satisfaisante. Signalons cependant la rapidité et la qualité des résultats obtenus avec le bleu de toluidine. Nous croyons, comme Bencosme, que c'est, avec la microscopie en contraste de phase, un excellent procédé de contrôle, en étape préliminaire à l'examen au microscope électronique.

Nous avons enfin pratiqué quelques recherches histochimiques : elles n'ont qu'une valeur très relative, comme nous l'avons vu.

TROISIÈME PARTIE

RÉSULTATS

CHAPITRE I

Histologie du rein normal

Rappel des connaissances actuelles

En tentant une synthèse des données classiques et ultrastructurales, nous envisagerons successivement le glomérule de Malpighi, l'appareil juxta-glomérulaire et le tube rénal.

Le Glomérule de Malpighi

C'est une formation sphérique, de 200 microns de diamètre, en moyenne ; il est composé d'un feuillet pariétal, la capsule de Bowman, délimitant la chambre glomérulaire ; le tube rénal en part au pôle urinaire. La plus grande partie de la chambre glomérulaire est occupée par l'épanouissement de capillaires situés entre deux artérioles : c'est le floculus ou glomérule proprement dit, de structure complexe. On appelle pôle vasculaire du glomérule, le point d'attache de cette touffe vasculaire, correspondant à l'entrée des artérioles dans le glomérule.

1° La capsule de Bowman est la partie la plus externe du corpuscule ; elle est formée de cellules reposant sur une basale.

— Les cellules sont des éléments aplatis, à cytoplasme normalement peu visible, au noyau allongé bombant dans la chambre glomérulaire ; elles se continuent au niveau du pôle urinaire avec l'épithélium tubulaire en prenant un type glandulaire ; ces cellules subissent des modifications considérables au cours des divers états pathologiques.

— La membrane basale, épaisse de 0,3 μ à 0,5 μ, est très bien mise en évidence par le P.A.S. ; sa structure est régulière, paraissant parfois feuilletée. Elle se continue apparemment sans interruption avec la membrane basale du néphron et sépare le glomérule du tissu interstitiel rénal.

Sa disposition au niveau du pôle vasculaire a été très discutée. Nous verrons, en étudiant la basale glomérulaire, les diverses descriptions qui en ont été données.

2° Le glomérule. L'élément fondamental du glomérule en est le réseau *capillaire* ; l'architecture en a été précisée par des coupes sériées et on peut la schématiser ainsi :

L'artériole afférente se dilate à son entrée dans le corpuscule en un sinus, puis se divise en 2, 3, 4 branches lobulaires (Vimtrup, 81) non anastomosées entre elles ; chacune est le point de départ d'une dizaine d'anses capillaires en moyenne, non anastomosées en réseau, se réunissant classiquement pour constituer l'artériole efférente, après s'être groupées en branches lobulaires efférentes. Cette conception classique a subi quelques modifications. Pour Hall, il existerait dans chaque lobule, allant du vaisseau afférent au vaisseau efférent, un capillaire court-circuitant les anses terminales et donc tout à fait comparable aux capillaires de jonction de Zweifach et Chambers. Boyer (20) décrit, en outre, des capillaires anastomotiques, scalariformes, entre les anses d'un même lobule, transformant ces vaisseaux parallèles en un véritable réseau.

Cette arborisation vasculaire flotte dans la chambre glomérulaire, mais elle n'y est pas libre : elle est recouverte d'une *membrane*. Celle-ci suit les diverses anses glomérulaires, les isolant l'une de l'autre en leur fournissant une sorte de meso. Mais son autre face supporte des éléments cellulaires la séparant de la chambre glomérulaire. On peut donc la considérer, soit comme une basale « épithéliale », correspondant à la basale capsulaire refoulée par les vaisseaux, soit comme vasculaire, suite de la basale artériolaire. Cette dernière hypothèse était celle de Bowman. Elle est reprise récemment par Hall : pour lui, les artérioles glomérulaires perforent la capsule, se divisent en capillaires et la membrane basale glomérulaire est uniquement vasculaire.

Cette opinion a eu peu d'audience et la plupart des auteurs ne mettent pas en doute la continuité des feuillets pariétal (capsulaire) et viscéral (glomérulaire) de la membrane basale. Mais les capillaires sont-ils recouverts uniquement de cette membrane ou conservent-ils une basale propre ? Cette question n'a pas qu'un intérêt purement théorique et descriptif, car de la réponse donnée découlèrent des interprétations très différentes des néphropathies.

Schématiquement, deux opinions sont en présence :

— l'une est soutenue essentiellement par les usagers de la microscopie électronique : il n'y a qu'une basale de 0,2 à 0,4 microns d'épaisseur ; une zone centrale en est peut-être plus osmiophile ; mais on ne peut distinguer dans cette formation la part qui reviendrait à un constituant vasculaire autonome : c'est l'opinion de Dalton, Pease, Mueller, Yamada, Putois, Régnier ; nous arrêtons là une énumération qui serait fastidieuse. Il y a, pour eux, au pôle vasculaire, réflexion de la basale pariétale sur les vaisseaux et disparition ou « absorption » de la basale vasculaire, qui disparaît dans le glomérule. Seuls Oberling et Gautier ont décrit en 1951 une double membrane visible au microscope électronique.

Mac Manus et Montaldo, en utilisant la microscopie optique, arrivent à la même conclusion : la membrane basale est une et d'origine capsulaire, l'endothélium du capillaire reposant directement sur elle.

A l'opposé, de très nombreux auteurs adoptent l'opinion de Bargmann ou de Jones : comme tous les capillaires de l'organisme, le capillaire glomérulaire a une basale propre. Il y a donc, à l'intérieur du feuillet réfléchi de la capsule de Bowman, une deuxième membrane d'origine endothéliale. Ces deux feuillets sont normalement indissociables, c'est l'opinion d'Allen. Pour Zimmermann, puis pour Bohle et Krecke, Churg et Grishman, on peut observer cette basale capillaire là où manque la basale glomérulaire, c'est-à-dire au niveau du mésangium.

Jones, de son côté, affirme l'existence d'un espace péricapillaire contenant quelques fibrilles collagènes, limité par les deux membranes, vasculaire et glomérulaire.

Tous les auteurs partisans de la dualité de la membrane basale, tirent argument de la très grande netteté avec laquelle ils l'observent au cours de divers états pathologiques : glomérulonéphrite aiguë, éclampsie, amylose, qui amènent une séparation et un isolement de ses constituants. Cette localisation, à l'espace péricapillaire, des processus pathologiques, a été soutenue par Mc Callum (55) dès 1934 ; il se basait sur l'étude d'une amylose rénale sévère. Goormaghtigh, Churg et Grishman (34), Bohle et Krecke (15) ont, par la suite, adopté le même point de vue. Il y a donc là une discordance très nette entre les données fournies

par les diverses méthodes d'examen : pour la microscopie électronique, une seule membrane restant une en toutes circonstances, pour la microscopie optique deux basales accolées et échappant à l'analyse à l'état normal, bien isolées dans les processus pathologiques. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette discordance :

— d'abord, la différence de matériel et de technique : la microscopie électronique utilise, après prélèvement biopsique, un fragment fixé à l'acide osmique et inclus au méthacrylate, alors que les travaux de microscopie optique ont été faits, pour la plupart, sur des pièces de nécropsie après fixation au formol ou au Zenker ;

— par ailleurs, l'examen au microscope électronique indique des différences de densité optique, donc d'osmiophilie.

Les auteurs « dualistes » emploient de leur côté, tous, la coloration de Jones. Nous avons indiqué, dans notre précédent chapitre de technique, ses caractéristiques : oxydation periodique, suivie d'une réduction argentique par une solution de nitrate d'argent-uroformine : cette réduction est effectuée pendant 2 ou 3 heures ; elle est donc susceptible, comme toute réduction argentique, de dépôts aberrants. Tous les auteurs employant cette technique reconnaissent la variabilité des images, selon le fixateur employé. Le P.A.S. classique montre des aspects parfois dissemblables (46, 25).

Ayant utilisé un matériel prélevé et préparé pour la microscopie électronique et employé d'autres techniques que celle de Jones, nous pourrons discuter le rôle de ce facteur technique et apprécier son importance.

Nous préférons le terme de « *cellules de recouvrement* », traduction littérale des « Deckzellen » de Zimmermann (86), à celui de cellules épithéliales. Ce qualificatif est le plus utilisé ; son emploi n'est justifié ni par l'embryologie, ni par l'histologie car ces cellules naissent du mésenchyme, sans plan de fonctionnement physiologique et ne forment pas une couche continue. Il est logique de les considérer comme l'équivalent des cellules tapissant la capsule de Bowman ; l'examen au microscope électronique a permis leur description exacte : leur forme est très irrégulière, étoilée, aux multiples prolongements ou trabécules, déjà vus par Zimmermann en microscopie opti-

que. De ceux-ci naissent de très nombreuses expansions, visibles uniquement en microscopie électronique, les pédicelles ou « foot process ». Ceux-ci s'appliquent sur la membrane glomérulaire, soutenant dans la chambre capsulaire, comme sur des échasses, le corps cellulaire. Au sein de celui-ci se trouve le noyau, de forme régulière. Le noyau sera donc toujours à distance de la membrane. L'aspect de cette cellule en méduse lui a valu le nom de podocyte sous lequel elle est actuellement fréqumement désignée. Nous n'insisterons pas plus longuement sur les détails architecturaux de ces cellules, ni sur leur rôle physiologique envisagés dans des travaux antérieurs (73, 19).

Les *cellules endothéliales* des capillaires sont, suivant les conceptions des auteurs, séparées des cellules de recouvrement, soit par la basale glomérulaire seule, soit par celle-ci, l'espace péricapillaire et la basale propre du capillaire. Elles ont un noyau aplati, un cytoplasme peu abondant, plaqué tout autour du capillaire ; c'est une mince couche symplastique de 0,03 microns d'épaisseur où l'on décrit de nombreux pores : lamina fenestrata.

Il existe des différences considérables dans l'estimation du nombre respectif des cellules endothéliales et des cellules de recouvrement. Le traité de Maximov et Bloom indique une proportion de dix cellules de recouvrement pour une cellule endothéliale. Allen (4), de son côté, estime leur nombre équivalent. Putois (71), après Rhodin, Mueller, Rinehart, trouve trois fois plus de cellules endothéliales que de podocytes. De telles variations s'expliquent, d'une part, par la difficulté de reconnaître avec certitude, sur une préparation histologique classique, ces deux catégories cellulaires, d'autre part, par la difficulté en microscopie électronique, d'observer l'ensemble d'un glomérule.

Zimmermann (87) décrit sous le nom de *mesangium* un ensemble de cellules histiocytaires, indépendantes et différentes des cellules endothéliales du capillaire, mais comprises comme elles entre les replis de la membrane basale. Elles sont l'homologue du mésentère compris entre deux feuillets péritonéaux. Goormaghtigh (36), pour sa part, en fait des éléments myoïdes, donc contractiles. Suivant ces conceptions, les capillaires ont une partie libre, recouverte par la membrane basale, et une partie en rapport avec le mesangium. Bohle (15) décrit deux types de

disposition, soit en feuille de trèfle : trois ou quatre anses capillaires s'insérant sur le même axe mésangial, soit en chaîne : des capillaires parallèles étant séparés par des travées mésangiales. Il retrouve ces aspects sur des coupes sériées, éliminant ainsi l'hypothèse d'une incidence de coupe donnant de telles images.

Jones, Churg et Crishman décrivent également un espace intercapillaire conjonctif, de disposition analogue, suite logique de l'espace péricapillaire.

Ces données de la microscopie optique n'avaient pas été initialement confirmées par l'examen électronique : Farquar, Hall, Mueller, Elias nient l'existence de ce mésangium, rejoignant ainsi les micrographes classiques Borst, Clara, Allen, Bell. Pour ces auteurs, cet aspect est dû à une superposition de cellules endothéliales réalisant une « tige glomérulaire », mais il ne rentre dans ces amas ni cellules, ni fibres extra-capillaires.

De leur côté, Kurtz et Mac Manus (57) proposent une interprétation intermédiaire : il y aurait deux types de cellules endothéliales : les cellules bordant le capillaire, formant la lamina fenestra et des cellules à cytoplasme plus dense, les « interluminal cells aggregats », formant la tige glomérulaire.

Ce tissu interstitiel se continuerait dans le pôle vasculaire où Bohle (16) et, plus récemment Oberling (66), ont décrit des cellules conjonctives cheminant entre les vaisseaux afférents et efférents, en étroit rapport avec eux.

On ne peut cependant affirmer la continuité absolue de ce tissu conjonctif « polaire » avec le mésangium ; peut-être celui-ci n'est-il qu'un amas de cellules interstitielles, isolées dans les anses capillaires.

En résumé, les points suivants sont admis par la plupart des auteurs : les anses capillaires, avec leur endothélium, sont séparées de la chambre glomérulaire par une membrane basale sur laquelle semblent s'insérer isolément les podocytes ; cette membrane les entoure comme une séreuse et se continue avec la basale pariétale de la capsule de Bowman et donc avec celle de tout le néphron.

Sont discutés les points suivants : la présence de cellules interstitielles dans le glomérule, l'existence d'une basale capillaire propre, l'existence d'un espace péricapillaire, siège de nombreux phénomènes pathologiques.

Nous croyons d'ailleurs que les recherches embryologiques exposées dans la thèse de Madame Lazorthes (51) éclairent la question d'un jour nouveau : il n'y a qu'une membrane basale apparaissant entre les podocytes en voie de différenciation et une masse mésenchymateuse dans laquelle apparaîtront plus tard les capillaires ; cette basale glomérulaire est d'apparition plus tardive que la capsule de Bowman et s'y raccordera secondairement au niveau du pôle vasculaire. La membrane est unique, se différenciant sur place avant les capillaires ; enfin la masse mésenchymateuse glomérulaire peut donner, outre les capillaires, des cellules interstitielles, mésangiales. Il reste à préciser les modalités de raccordement de ces capillaires glomérulaires, sans basale propre et formés sur place, avec le système vasculaire général, qui lui, repose sur une basale propre.

L'appareil juxtaglomérulaire

Nous décrivons sous ce nom, deux éléments topographiquement voisins, mais peut-être de signification très différente :

a) Les cellules épithélioïdes, cylindriques, décrites parallèlement par Ruyter (77) et Oberling (65) ; dans la paroi de l'artère afférente, avant de pénétrer dans le glomérule, les cellules musculaires de la paroi deviennent plus volumineuses, d'allure épithélioïde et contiennent des granulations d'abondance et de taille variable. Nous ne reviendrons pas sur leur rôle hypothétique dans la sécrétion de la rénine (Goormaghtigh, 36). Néanmoins leur étude récente au microscope électronique (Oberling, 66), montre une ultrastructure semblable à celle des cellules glandulaires avec un ergastoplasme bien dessiné et un chondriome abondant. Morphologiquement, elles paraissent être des éléments sécrétants.

b) Sous le nom de « Polkissen » (littéralement : coussin polaire), Zimmermann (87) décrit une accumulation de cellules aplaties, à cytoplasme clair, sans granulations, semblant être un épaississement de la paroi artérielle, et s'étendant jusqu'au tube distal ; celui-ci présente en regard de ce Polkissen des modifications que nous indiquerons plus loin ; Oberling, dans l'étude citée, décrit cette forma-

tion sous le nom de lacis ; il a observé au microscope électronique l'existence d'un réseau de substance comparable à celle des membranes basales, enserrant des noyaux de forme variable, souvent encochés ; le cytoplasme des cellules est assez clair et pauvre en organites. Pour Oberling, ces cellules accompagnent l'artériole dans le glomérule et formeraient le mésangium. La signification de ces divers éléments est encore discutée et ils méritent une étude approfondie.

Cette carence de documents histophysiologiques précis a amené Ham à indiquer uniquement leur existence dans son dernier traité.

Le tube rénal

Sa structure pose beaucoup moins de problèmes, du moins morphologiques, car il y a concordance de toutes les descriptions ; les difficultés résident dans la localisation des diverses fonctions physiologiques. Aussi serons-nous assez bref sur cette partie du néphron en insistant sur les caractéristiques de chacune de ses parties.

Nous renvoyons aux travaux de Sjostrand et Rhodin (74), Pease, et aux thèses de Putois (71) et Régnier (73) pour un exposé plus détaillé des constitutions ultrastructurales.

1° Le tube contourné proximal : il est fait de 3 à 5 cellules aux limites floues entourant une lumière étroite ; elles présentent une bordure en brosse de un micron d'épaisseur, dont la structure fine n'est analysable que par le microscope électronique ; leur cytoplasme apical comprend, en outre, des granulations, des vacuoles et un appareil de Golgi juxta-nucléaire. Le noyau occupe la partie moyenne de la cellule ; entre lui et la membrane basale, se trouvent les mitochondries, allongées et parallèles, constituant les stries de Heidenhain. Elles sont enserrées dans les replis de la membrane basale constituant les β cytomembranes.

2° Anse de Henlé : sa branche descendante est caractérisée par son diamètre réduit (20 microns), l'aplatissement des cellules dont le noyau bombe dans la lumière tubulaire, la disparition de la bordure en brosse et des stries de Heindenhain. Sa branche montante a la même structure que le tube contourné distal, avec réapparition progressive d'un chondriome abondant.

3° Tube contourné distal : les cellules retrouvent un type voisin des éléments du tube proximal ; mais elles s'en distinguent par divers points : leur nombre — 7 ou 8 cellules limitent une cavité tubulaire à lumière plus importante —, l'absence de bordure en brosse, la position plus apicale du noyau faisant saillie dans la lumière tubulaire, enfin l'importance des stries de Heindenhain, longues de 3 microns et tassées en paquet dans la partie basale de la cellule en masquant le cytoplasme, confèrent à ces éléments leur individualité.

Le tube distal vient au contact du glomérule dont il est séparé par le Polkissen. Ses cellules présentent à ce niveau une différenciation. Elles sont plus hautes, donnant un tassement des noyaux ; le chondriome est dispersé dans le cytoplasme et surtout la membrane basale prend un aspect très irrégulier, parcellaire, laissant passer des prolongements cytoplasmiques qui se perdent dans le lacis du Polkissen (66) : c'est la macula densa.

4° Tube collecteur : sa lumière est large, limitée par des cellules cubiques de deux types : claires et sombres ou intercalaires, au cytoplasme bourré de granulations.

Tels sont, brièvement résumés, les signes distinctifs des diverses portions du tube rénal ; nous ne nous y sommes pas attardé car son étude ne bénéficie pas particulièrement de l'emploi des coupes semi-fines : elle doit être ou histochimique, ce qui interdit la fixation osmiée, ou cytologique et là rien ne saurait être préféré au microscope électronique.

Contribution personnelle

1° Le glomérule.

On peut dire, sans exagération, que son étude est transformée par l'emploi de coupes semi-fines : l'image en est d'une netteté parfaite, car aucune superposition ne vient obscurcir la disposition des anses glomérulaires dont on identifie aisément les différents constituants.

Nous ne dirons rien de la capsule de Bowman, dont la structure simple rend superflu l'emploi de coupes semi-fines. Par contre, nous détaillerons davantage les observations faites sur le floculus glomérulaire.

Son architecture est aisément reconnaissable : selon le plan de coupe on peut voir, soit le sinus glomérulaire et ses rameaux lobulaires, soit l'épanouissement d'un lobule en ses anses.

La métachromasie provoquée colore avec la netteté d'un schéma, la *membrane basale* glomérulaire ; nous observons ainsi très facilement l'agencement des anses capillaires : nous avons retrouvé très fréquemment les aspects décrits par Bohle (16), soit en trèfle, soit en chaîne ; ils nous semblent constituer deux éléments fondamentaux de l'architecture du lobule.

C'est encore grâce au dessin linéaire de la basale que se reconnaissent avec certitude les autres constituants du glomérule.

Les *cellules de recouvrement* sont en dehors d'elle ; si elles sont en regard du bord libre des anses capillaires, elles sont facilement identifiées ; par contre, placées entre les anses, en position profonde, près du centre glomérulaire, elles seraient considérées comme endothéliales sur une coupe plus épaisse. Leur cytoplasme occupe le fond du golfe limité par deux anses voisines qu'elles recouvrent de leurs trabécules bien visibles. Nous remarquons constamment l'espace clair existant entre le corps cellulaire du podocyte et la membrane basale : on peut même, dans certains cas, deviner les prolongements cellulaires qui le traversent, quoique leur taille soit au delà du pouvoir de résolution du microscope. Il se produit alors un phénomène de diffraction, analogue à celui qui est utilisé dans l'observation à fond noir, permettant de percevoir leur présence sans obtenir d'images nettes.

On peut encore apprécier sur nos préparations l'état du cytoplasme, vacuolaire ou contenant des inclusions hyalines dans certains états pathologiques ; quant au noyau arrondi ou ovalaire, il a une structure homogène, de règle après la fixation osmique.

Les *cellules endothéliales* sont dans les replis de la membrane basale ; leur noyau est toujours net, régulier, entouré normalement de peu de cytoplasme. La lamina fenestrata n'est pas visible ; on peut noter parfois une mince lame cytoplasmique doublant la basale. On les distingue facilement des éléments sanguins : hématies de

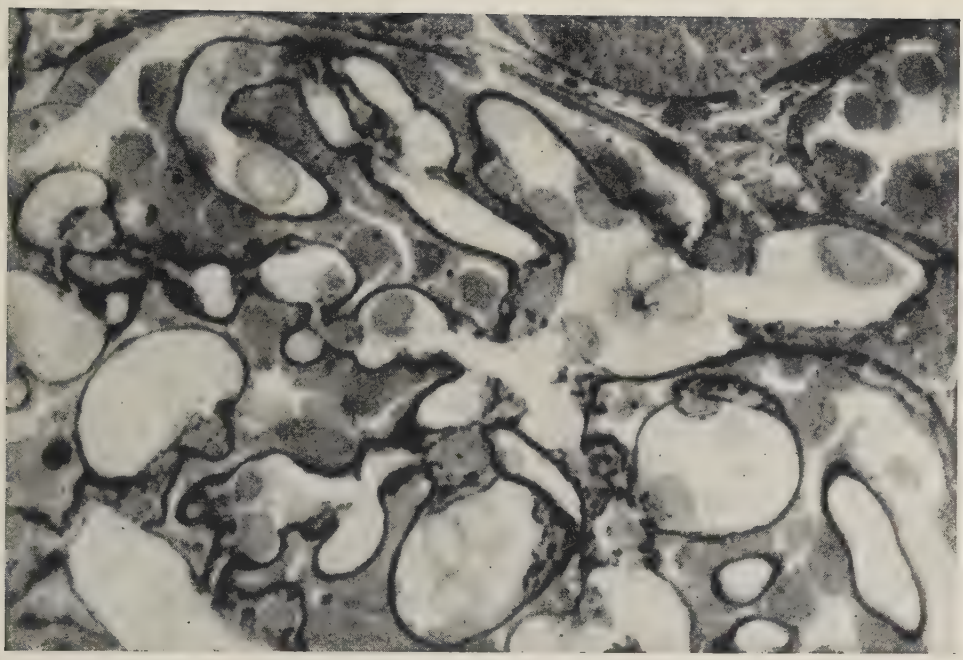


Fig. 1. — Architecture générale d'un glomérule : à droite le sinus glomérulaire d'où partent les capillaires, contenant les hématies ; les podocytes sont en dehors de la membrane glomérulaire. L'œdème (il s'agit d'une glomérulite aiguë en phase initiale) met bien en évidence les espaces intercapillaires. *Gross. : 40 × 45 (le premier chiffre indique le grossissement de l'objectif, le second les agrandissements ultérieurs : oculaire et photographique).*

forme régulière, colorées orthochromatiquement en bleu, leucocytes au noyau irrégulier et au cytoplasme arrondi, indépendant de la basale.

Nous avons observé à plusieurs reprises des images de *mésangium*, surtout au centre des « feuilles de trèfle » de Bohle. Il se produit à ce niveau un plissement des membranes basales donnant à leur insertion sur cet axe, un aspect « tire-bouchonné », suivant l'expression de Bohle ; mais la convergence de ces membranes n'amène jamais leur fusion. Elles sont séparées par une plage à contenu granulaire, contenant parfois des éléments filamenteux de 0,5 à 1 micron, se colorant comme la membrane basale. On y trouve même parfois un noyau bien particulier, car il présente une incisure lui donnant un aspect en bissac ; ce noyau occupe le centre de cet espace intercapillaire et ne semble pas pouvoir être rattaché à un endothélium. Nous croyons donc à la présence dans le glomérule, d'éléments non vasculaires, situés dans l'espace intercapillaire que dessine la convergence des anses lobulaires ; ces cellules centro-lobulaires jouent-elles un rôle dans les processus pathologiques ? Nous l'examinerons plus loin.

L'existence d'un espace péricapillaire nous paraît beaucoup plus discutable : pour nous en tenir à l'observation de glomérules normaux, nous n'avons évidemment observé qu'une basale sur le bord libre des anses ; nous n'avons pas non plus observé de basale propre en regard du mésangium, comparable à celles décrites par Jones ou Bohle ; il ne s'agit pas d'une non colorabilité par la métachromasie provoquée, puisque celle-ci met très bien en évidence la basale des capillaires intertubulaires. Nous trouvons là une discordance entre nos résultats et ceux des auteurs employant la technique de Jones ; il est possible que celle-ci colore les limites cellulaires et ne soit donc pas spécifique des membranes basales ; elle montrerait donc la séparation entre cellules endothéliales et mésangiales, ou entre les diverses variétés endothéliales de Kurtz et Mac Manus.

Nous retrouverons ces divergences dans l'étude des lésions de glomérulonéphrite aiguë.

Les aspects en chaîne des capillaires permettent aussi d'isoler, entre les chaînons constitués par les sections vas-

culaires, de petites zones de diamètre inférieur au micron où l'on retrouve parfois quelques éléments se colorant comme la membrane basale.

Nous avons parfois observé sur les coupes de pôle vasculaire, des images indiquant une pénétration de tissu interstitiel autour des artérioles ; les travaux de Bohle et Herfart indiquent l'importance qu'a l'orientation du plan de coupe dans l'étude de cette région. Des déductions valables ne peuvent être tirées que de l'étude de coupes sériées.

Nous résumons ainsi nos possibilités d'observation : sur coupes semi-fines de 0,4 microns, colorées par métachromasie provoquée, les divers constituants glomérulaires sont parfaitement isolés ; le cytoplasme des cellules épithéliales, la disposition des membranes basales dessinant l'architecture des anses capillaires, sont d'une observation très facile. On peut affirmer l'existence d'espaces intercapillaires, occupés parfois par une cellule ou des fibrilles se colorant comme la basale glomérulaire. Mais il ne semble pas y avoir de basale capillaire propre. L'étude embryologique fournit un argument pour expliquer l'intrication étroite des cellules endothéliales et mésangiales. L'emploi des coupes semi-fines nous apparaît supérieure à la microscopie électronique pour l'étude de l'architecture glomérulaire dans son ensemble : en effet, le pouvoir séparateur de celle-ci est superflu, et l'exiguïté de son champ d'observation rend malaisée une vision d'ensemble, même d'un seul lobule glomérulaire.

Enfin, la métachromasie provoquée semble être une coloration des membranes basales beaucoup plus élective que la technique de Jones, qui colore en brun noir tous les espaces mésangiaux.

2° L'appareil juxta-glomérulaire.

L'étude de celui-ci est aisée par notre méthode. En effet, d'une part les cellules épithélioïdes sont facilement reconnues car leurs granulations se colorent intensément en violet, d'autre part, le Polkissen de Zimmermann est reconnaissable par sa situation : il est littéralement coincé entre le glomérule, l'artère afférente et le tube distal, dont

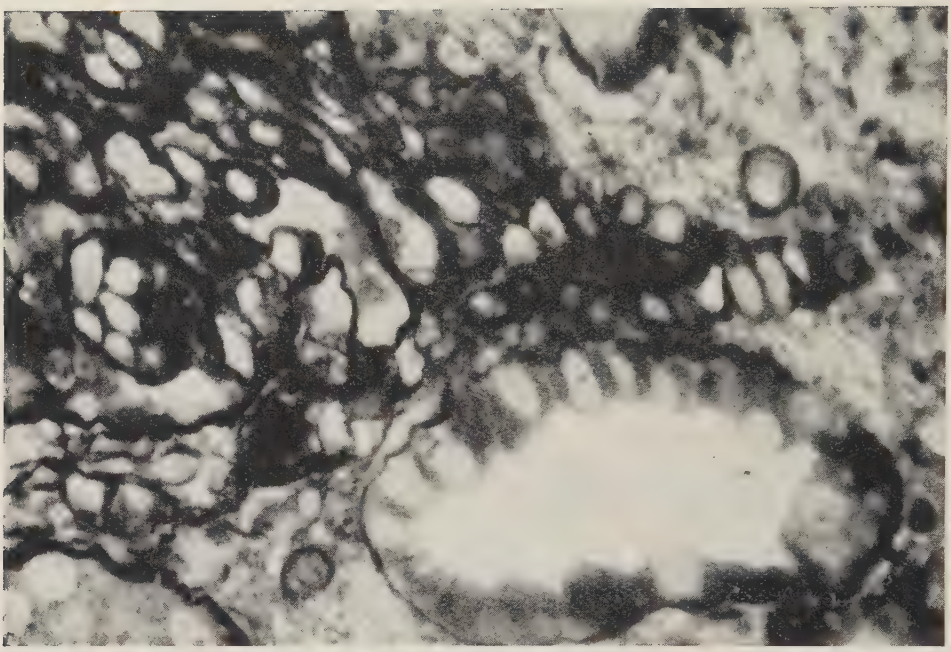


Fig. 2. — Appareil juxtaglomérulaire : en bas, le tube contourné distal ; au dessus, les cellules de la media artériolaire coupées tangentiellement ; au centre, en haut, une cellule granuleuse contenant une volumineuse inclusion ; à gauche, glomérule sclérosé aux membranes basales plissées. Remarquer l'interruption de la basale tubulaire en regard des cellules du lacis. *Gross. : 40 × 45.*

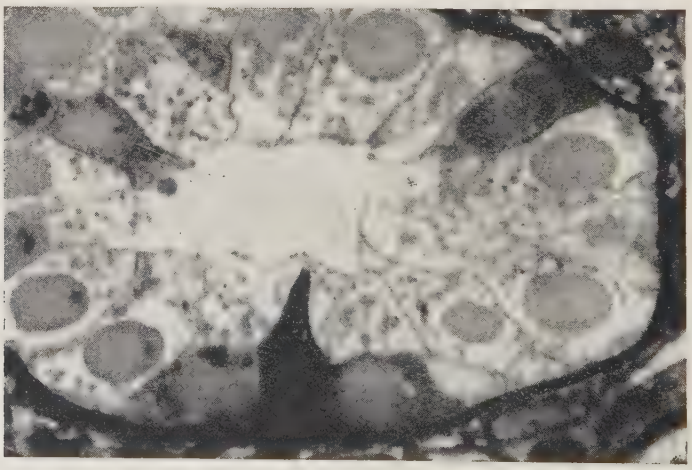


Fig. 3. — Tube de Bellini présentant trois cellules sombres intercalaires. *Gross. : 100×19.*

la membrane n'est plus colorable à ce niveau : il n'existe donc aucun barrage entre les cellules tubulaires et celles de la media artérielle. Cette disposition est-elle le reflet d'une activité physiologique particulière ou simplement un vestige de l'embryogénèse du néphron, comme le suggèrent les travaux de Madame Lazorthes ? Nous ne pouvons encore conclure. Ainsi l'examen de coupes semi-fines avec coloration par la métachromasie provoquée, permet de retrouver facilement l'appareil juxta-glomérulaire et d'orienter ainsi l'examen en microscopie électronique.

3° Le tube rénal.

Pour son étude, la métachromasie provoquée est insuffisante ; elle colore les membranes basales, les bordures en brosse et les inclusions hyalines, mais donne peu de détails sur le contenu cytoplasmique. Nous préférons y associer soit une surcoloration par la fuchsine de Ziehl, soit une argentoréduction provoquée ; les deux méthodes mettent également bien en évidence le chondriome.

On peut ainsi reconnaître les diverses portions du tube rénal, grâce aux caractéristiques rappelées plus haut et faire une évaluation sommaire de leur contenu cytoplasmique : inclusions hyalines et cellules intercalaires belliniennes se colorent métachromatiquement et sont donc bien visibles ; il est évidemment impossible d'étudier les modifications du chondriome avec la précision de la microscopie électronique ; on peut simplement orienter cet examen.

On voit donc, d'après ce résumé de nos observations personnelles, l'intérêt majeur de cette méthode d'examen pour l'étude du glomérule rénal ; elle est indispensable pour une compréhension générale de ses lésions.

Par contre, elle ne saurait jouer qu'un rôle de recherche préliminaire avant l'étape électrono-microscopique, dans l'étude des autres constituants du néphron : tubule et appareil juxta-glomérulaire.

CHAPITRE II

Anatomie pathologique des néphropathies de l'enfant

Notre étude anatomo-pathologique est basée sur l'examen de coupes de ponction-biopsie rénales. Les prélèvements ont été traités suivant la technique que nous avons déjà décrite et proviennent de la Clinique Médicale Infantile du Professeur Sorel, où ce procédé d'examen est en usage depuis plus de trois ans. C'est dire que notre étude est limitée aux néphropathies courantes de l'enfance : ce point ne doit pas être oublié : nos conclusions ne sauraient avoir une portée générale. Ainsi elles ne sauraient s'appliquer aux néphropathies de « surcharge » : amylose, syndrome de Kimmelstiel-Wilson, ni aux localisations rénales des maladies « du collagène ». En outre, notre attention s'est fixée surtout sur les glomérulopathies dont les lésions sont beaucoup plus faciles à étudier en microscopie optique classique.

Nous décrirons d'abord, d'une manière analytique, les lésions élémentaires du glomérule, telles qu'elles apparaissent sur nos préparations. Nous tenterons une étude synthétique des diverses néphropathies en nous appuyant sur ces données analytiques et nous les comparerons aux résultats des examens faits en microscopie optique classique et en microscopie électronique.

Etude analytique des lésions

Il convient d'étudier séparément le floculus et la capsule de Bowman ; en effet, dans la majorité des cas, le processus lésionnel débute dans le premier ; seules certaines affections primitivement interstitielles amèneraient une atteinte d'abord capsulaire ; nous n'en avons pas observé.

Le floculus comprend quatre parties ; un endothélium limitant une lumière capillaire, une membrane glomérulaire, des podocytes, et enfin des cellules interstitielles. Chacun de ces éléments réagira d'une façon propre au cours des divers états pathologiques.

Les capillaires et leurs revêtements doivent être étudiés en premier lieu à cause de leur prépondérance lésionnelle. Leur atteinte sera marquée de diverses façons ; elle sera d'abord purement fonctionnelle, sans substratum morphologique précis, réalisant soit un spasme, soit au contraire une vasodilatation : on sait les discussions que soulèvent les problèmes de la circulation glomérulaire. Nous n'avons jamais observé d'ischémie indiscutable, car notre mode de prélèvement par aspiration peut être responsable d'une fuite des hématies. Cette ischémie a cependant été observée dans les insuffisances rénales fonctionnelles aiguës.

Par contre, une dilatation marquée s'observe dans certains états pathologiques : le glomérule occupe toute la chambre capsulaire, ses capillaires ont un contour circulaire, sans replis importants, leur lumière est dilatée ; mais on y trouve peu d'hématies. Il semble y avoir plus une sorte d'œdème, qu'une congestion, de mécanisme encore peu précis.

Les lésions deviennent plus importantes et plus caractéristiques quand apparaissent les réactions de *l'endothélium*. Elles peuvent avoir une importance variable suivant l'affection et suivant même le glomérule examiné. Mais, en général, tout l'endothélium d'un glomérule atteint présente des modifications. La plus discrète nous semble être la multiplication cellulaire ; elle est facile à saisir sur nos préparations où sont nettement isolés les éléments contenus dans la membrane basale. Elle est marquée par une augmentation du nombre des noyaux qui gardent cependant leur silhouette régulière.

Mais, à cette multiplication cellulaire, s'ajoute rapidement une turgescence cytoplasmique. Celle-ci peut être parcellaire, ne frappant alors qu'une seule cellule dont le cytoplasme devient net, bombant dans la lumière du capillaire. Celui-ci paraît parfois obstrué par cet accroissement de sa paroi. On peut facilement éliminer, dans la création d'une telle image, le rôle des leucocytes en margination : leur noyau est de forme irrégulière, leur cytoplasme se colore plus vivement et n'est pas en continuité aussi étroite avec la

paroi. Cette réaction cytoplasmique peut être localisée à une anse ou être diffuse ; elle peut être plus intense, se traduisant par l'apparition, entre les cellules, d'un matériel ayant les mêmes réactions tinctoriales que la membrane basale, qui dessine les limites cellulaires. En même temps, on note généralement une plus grande colorabilité cytoplasmique. Nous ne pouvons préciser s'il s'agit d'un produit de sécrétion cellulaire ou, hypothèse plus probable, d'un dépôt de protéines plasmatiques (fibrine ?).

Nous pouvons trouver dans un même glomérule des réactions d'intensité différente : des lobules montrent simplement une turgescence endothéliale, alors que dans d'autres, on trouve un tableau caractéristique : l'anse capillaire a un contour circulaire, ou polycyclique ; sa lumière a disparu et l'on n'y trouve ni hématies, ni leucocytes ; la membrane basale entoure des cellules endothéliales tassées les unes contre les autres. Leurs limites sont soulignées par un lacis se colorant comme la membrane basale, donnant un aspect réticulé à l'ensemble : nous sommes ici en présence d'une endocapillarite obstructive dans sa forme la plus marquée. Mais il n'y a pas de thrombose puisqu'il n'y a aucun élément sanguin dans les capillaires. Il faut rappeler que la thrombose intracapillaire a été observée dans l'érythématoviscérite maligne, dans le syndrome de Moschowitz, dans certaines néphrosclérose malignes, affections que nous n'avons pas eu l'occasion d'observer.

Les réactions endothéliales sont donc parlantes, faciles à mesurer sur nos préparations ; elles vont de la multiplication cellulaire à l'endocapillarite obstructive.

L'étude de la *membrane glomérulaire* est incontestablement menée avec une précision parfaite grâce à la microscopie électronique qui permet de relever des modifications minimes. De son côté, l'examen des coupes semi-fines donne des résultats supérieurs à ceux donnés par les méthodes classiques : suppression des superpositions, diminution des erreurs dûes à l'incidence de coupe expliquent cela. Une irrégularité d'épaisseur et un aspect ondulé au niveau du raccordement avec d'autres membranes, à la tige glomérulaire sont des images normales et il ne faut point les considérer comme pathologiques.

Les altérations de la membrane glomérulaire peuvent présenter, à notre échelle d'observation, divers types : l'atteinte

la plus minime, la plus fréquemment rencontrée, est une modification irrégulière de l'épaisseur : le versant endothélial se hérisse d'excroissances irrégulières, de taille variable, de colorabilité identique ; elles se présentent tantôt comme des épines, tantôt comme des bourgeonnements à sommet arrondi.

Un degré plus avancé est réalisé par un épaississement diffus de toute la membrane, régulier en son contour ; nous avons noté exceptionnellement l'alternance de zones de colorabilité différente, longuement décrites par Jones (46), et Churg (25) ; elle ne nous semble pas être de règle, mais nous n'avons pu établir sa signification.

Une forme particulière de réaction de la membrane glomérulaire est l'apparition, sur le versant urinaire, podocytaire, d'un matériel de colorabilité plus faible ; celui-ci déforme la limite de la membrane, donnant une image en croissant, plaquée sur la convexité d'une anse.

Nous avons observé une concordance parfaite entre les conclusions de notre examen et celles de la microscopie électronique : toutes les modifications trouvées sur coupes semi-fines l'ont été en microscopie électronique, ce qui indique la fidélité de la coloration obtenue par la métachromasie provoquée.

Parfois nous avons trouvé un aspect de fissuration de la membrane, sur son versant endothélial, avec apparition d'espaces clairs dans son épaisseur ; mais cet aspect n'est pas interprétable avec certitude. Il y avait chaque fois une endocapillarite considérable et il s'agissait probablement d'apposition de matériel le long de la face interne de la basale et en ayant les mêmes réactions tinctoriales.

Mais nous n'avons jamais observé d'atteinte isolée de la basale glomérulaire : il s'y associait toujours et dans tous nos prélèvements, une réaction endothéliale ou interstitielle.

Les réactions des *cellules interstitielles*, trop négligées, nous semblent cependant importantes ; elles sont indissociables des modifications de l'espace intercapillaire.

La lésion initiale est un œdème de cet espace. Nous l'avons toujours rencontré associé à une prolifération endothéliale discrète et à un aspect dilaté des capillaires. Une modification du tonus vaso-moteur de tout le floculus pourrait expliquer ces diverses modifications. Cet œdème rend d'ailleurs plus visible les espaces intercapillaires et permet une

identification aisée des cellules interstitielles. Il ne représente, pensons-nous, qu'une modification fonctionnelle, réversible. Jamais nous n'avons constaté son extension à l'hypothétique espace péricapillaire, mais sa localisation limitée et exclusive au « mésangium ».

A ce changement réversible peuvent s'en ajouter d'autres, plus importants et de signification toute autre ; on voit apparaître dans les espaces intercapillaires, un dépôt de matériel de même coloration que la membrane glomérulaire. Sa disposition est le plus souvent fibrillaire, en tronçons de 1 à 2 μ de long, sans architecture réticulée ni raccordement à la basale.

Le plus souvent minimes, ces dépôts peuvent occuper tout l'espace intercapillaire, unissant les deux feuillets qui le limitent. Il est très difficile, à ce stade, de préciser l'origine des cellules emprisonnées dans ce dépôt. S'agit-il de cellules endothéliales vestigielles ? Il n'est pas possible de retrouver la silhouette nucléaire caractéristique des cellules interstitielles.

Nous ne pouvons donc affirmer l'existence d'une prolifération des cellules « mésangiales », n'en ayant jamais observé d'images indiscutables et pures.

Nous terminerons cette étude analytique des lésions fondamentales du floculus par celles qui intéressent le dernier élément, *les podocytes*.

On sait l'importance considérable que la microscopie électronique a permis d'attacher à leurs modifications : un syndrome néphrotique s'accompagne toujours d'une atteinte des pédicelles, qu'il s'agisse d'une disparition, d'une agglutination ou d'une distorsion ; les rapports existant entre membrane glomérulaire et cellule de recouvrement en sont modifiés : tantôt la cellule est plaquée « en ventouse » sur la membrane, tantôt elle semble sans rapport avec elle.

Une telle lésion des pédicelles est au delà des possibilités de la microscopie optique. Même en utilisant des coupes semi-fines, celle-ci peut, tout au plus, constater des modifications du liseré clair soulignant normalement la face urinaire des anses ; il paraît diminué ou, peut-être plus fréquemment, augmenté.

Par contre, on peut apprécier avec plus de facilité les modifications cytoplasmiques : œdème, apparition de vacuoles, le plus souvent multiples, d'inclusions hyalines.

Mais tout cela n'a pas la valeur pathognomonique de l'atteinte des pédicelles.

Une autre modalité réactionnelle des cellules de recouvrement est leur prolifération ; celle-ci s'apprécie très aisément sur nos préparations, puisque l'on a une vue d'ensemble du glomérule. Elle entraîne un comblement des scissures existant entre les anses, et peut, parfois, aller jusqu'à donner une couronne de noyaux, entourant une anse. Cet aspect est comparable à celui que l'on observe sur les glomérules embryonnaires.

Telles sont les données analytiques que l'on peut retirer de l'examen de glomérules pathologiques. Nous devons maintenant envisager les modifications de la *capsule de Bowman*, beaucoup plus simples.

Les cellules peuvent présenter des changements de forme : leur cytoplasme est plus abondant et les éléments deviennent cubiques. Parfois on y constate la présence de petites inclusions fortement colorées. Il faut éviter de considérer comme pathologiques les modifications de taille et d'aspect présentées par les éléments du revêtement capsulaire au voisinage du pôle urinaire ; l'examen du même glomérule sur des coupes sériées permet un premier contrôle. De plus, cette variation morphologique est progressive, harmonieuse, respectant le dessin circulaire de la chambre glomérulaire. Par contre, la turgescence pathologique est irrégulière, inégale dans des cellules voisines.

Un stade plus avancé est réalisé par la prolifération de ces cellules, s'entassant les unes sur les autres ; elles perdent ensuite toute structure épithélioïde, deviennent fusiformes et sont séparées par des travées d'un matériel se colorant comme la membrane basale, mais avec moins d'intensité.

Parallèlement à la réaction cellulaire s'observe une modification de la basale capsulaire. Celle-ci augmente d'épaisseur, généralement d'une manière grossière, sans présenter les petites déformation observables au niveau de la basale glomérulaire. Une structure fibrillaire peut souvent être notée à ce stade.

Il a été décrit une réaction isolée de la membrane capsulaire, sans modifications des cellules qu'elle supporte : elle se présente comme un épaississement homogène, moins colorable, afibrillaire : on est tenté d'interpréter ces faits

comme un gonflement œdémateux, lié plus aux réactions du tissu interstitiel qu'à celles du floculus. Mais rappelons encore les limites de notre étude, qui n'englobent pas les néphropathies dites ascendantes.

Après avoir indiqué les réactions glomérulaires, nous serons beaucoup plus brefs sur celles des autres constituants du néphron.

On ne peut actuellement rien affirmer sur la pathologie de *l'appareil juxta-glomérulaire* ; les données expérimentales et anatomo-pathologiques sont discordantes : l'examen de cet appareil demande la pratique de coupes sériées. Oberling a présenté récemment une étude de ce problème et nous n'avons rien à y ajouter.

Nous avons cependant trouvé à l'examen d'une anurie par glomérulonéphrite subaiguë, des modifications au niveau des cellules juxta-glomérulaires : leurs inclusions multiples étaient fondues en une seule, très volumineuse, de 5 à 6 μ de diamètre, gardant le même pouvoir chromotrope. Nous ne pouvons rien conclure d'un cas isolé, mais cela nous a paru digne d'être rapporté.

Nous ne nous arrêterons pas sur les *modifications tubulaires* : comme nous l'avons signalé à propos de l'histologie normale, leur étude ne bénéficie que médiocrement de la pratique de coupes semi-fines ; celles-ci ne permettent guère de pousser plus loin que l'histologie classique : inclusions hyalines ou glycogéniques, vacuolisation, desquamation cellulaire sont des lésions bien connues. D'un autre côté, le grossissement est trop faible pour permettre d'évaluer les modifications du chondriome ou des β cytomembranes, du ressort de la microscopie électronique.

Enfin, l'étude du tissu interstitiel n'est guère facilitée par notre méthode d'examen ; elle appartient encore presque exclusivement à l'histologie classique.

Groupements lésionnels

Cette analyse des réactions élémentaires du tissu rénal, observées sur des coupes semi-fines, nous amène à tenter une étude synthétique, précisant leur groupement dans les différentes néphropathies de l'enfant. Les glomérulonéphrites représentent la plus grande partie de notre maté-

riel. Nous suivrons dans notre exposé, un ordre de complexité croissante, qui est d'ailleurs, peut-être, l'ordre de succession lésionnelle de beaucoup d'entre elles.

Très schématiquement, trop peut-être, nous admettons que l'atteinte glomérulaire chez l'enfant est initialement soit podocytaire, soit endothéliale. L'atteinte primitive et isolée de la membrane glomérulaire a été cependant observée dans certains cas d'albuminurie isolée, mais uniquement par la microscopie électronique. Nous n'étudierons donc pas cette altération.

*
* *

Par altération podocytaire, nous entendons celle que l'accumulation, par de nombreux auteurs, de documents électrono-microscopiques, permet de considérer comme liée au *syndrome néphrotique* (19, 39). C'est peut-être, prendre un effet pour la cause. Cependant cette atteinte des pédicelles, isolée, diffuse, mais variable d'un point à l'autre, sensible à la thérapeutique, sans aucune autre lésion d'accompagnement notable, réalise le substrat anatomopathologique de la maladie d'Epstein, néphrose primitive, apanage presque exclusif de l'enfance.

Comment se traduira-t-elle sur nos coupes ? Par un tableau essentiellement négatif. L'architecture lobulaire est intacte, sans accentuation des espaces intercapillaires. Cependant, Jones (46) a décrit dans ces cas une densification de ces espaces ; ceci, à notre avis, correspond à leur aspect normal, quand ils sont virtuels. Le contenu des anses est normal : on y trouve hématies et parfois un leucocyte, le cytoplasme endothélial est peu visible. Enfin, la membrane basale est d'épaisseur et de dessin normaux, sans irrégularité. La capsule de Bowman ne montre pas non plus de modifications. On peut parfois trouver une légère turgescence de ses cellules et la présence de quelques inclusions hyalines, mais cela est loin d'être la règle.

L'atteinte des pédicelles ne peut pas être affirmée sur nos préparations. Elle sera parfois soupçonnée devant la constatation d'inégalités de l'espace clair suivant la basale. La présence de vacuoles ou d'inclusions hyalines dans le cytoplasme des cellules de recouvrement a également une valeur diagnostique si elle est le seul fait notable.

Parallèlement à ces lésions glomérulaires, on trouvera de très nombreuses inclusions hyalines dans les tubes contournés.

Le diagnostic de néphrose pure sera porté sur l'absence de modifications notables du floculus, contrastant avec des modifications des cellules podocytaires et la présence de nombreuses inclusions hyalines dans le reste du néphron.

Donc, par l'examen de coupes semi-fines, on pourra affirmer non un syndrome néphrotique, cliniquement évident, mais sa pureté, ce qui aura des conséquences thérapeutiques et parfois pronostiques importantes. L'histologie classique permettait, avec moins de précision cependant, les mêmes constatations. Nous n'avons pas retrouvé de glomérulite membraneuse dont Bell, puis Allen (4) font le substratum anatomique du syndrome néphrotique ; cela est peut-être vrai chez l'adulte, mais ne saurait être admis chez l'enfant, comme l'ont déjà souligné des travaux antérieurs. Nous n'avons pas non plus trouvé des lésions de la basale décrites par Spiro.

Ainsi, pour nous résumer, la lésion des podocytes considérée par la majorité des auteurs comme liée à tout syndrome néphrotique échappe à l'examen microscopique optique. Celui-ci ne fera donc pas faire un diagnostic, mais permettra d'évaluer les autres éléments qui peuvent le compliquer ou le provoquer, transformation d'une néphrose en néphrite (néphrose mixte des auteurs anglo-saxons) ou apparition d'un syndrome néphrotique au cours d'une néphrite subaiguë méconnue.

*
* *

Si les atteintes podocytaires nous échappent en grande partie, les atteintes endothéliales, autre grande avenue des glomérulopathies infantiles, seront beaucoup plus faciles à reconnaître : le diagnostic de *glomérulonéphrite aiguë* sera porté devant la prépondérance des images d'endocapillarite associée à une atteinte des cellules de recouvrement et des éléments interstitiels.

L'œdème des espaces intercapillaires, joint à un gonflement extrême des anses, donnant l'impression d'une pression intracapillaire élevée, sans obstruction des vaisseaux,

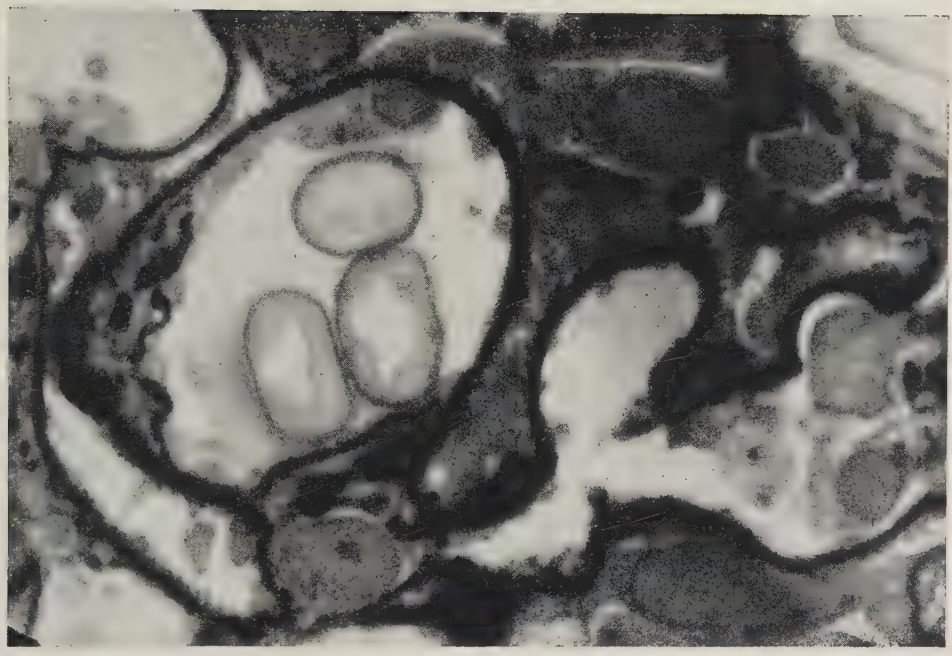


Fig. 4. — Réaction œdémateuse au cours d'une glomérulite aiguë (détail de la fig. 1). Noter la dilatation capillaire, l'œdème de la cellule intercapillaire au noyau encoché, l'apparition de dépôts « membrane-like » dans et à la surface des cellules endothéliales ; dans l'anse centrale, trois hématies. *Gross. : 100 × 45.*

semble être la lésion la plus précoce. Elle s'accompagne souvent de ce que nous avons décrit comme œdème de la basale capsulaire. Cette atteinte sera rarement pure : dans une anse ou un lobule, s'y ajoute l'endocapillarite. Les cellules endothéliales augmentées de volume réduisent considérablement la lumière vasculaire où l'on ne voit plus d'hématie ni de leucocyte. Enfin, l'apparition de dépôts intercellulaires se colorant comme la membrane glomérulaire, indique une atteinte importante, peut-être déjà irréversible.

Enfin, à ces deux éléments fondamentaux : œdème interstitiel et endocapillarite, s'ajoute une modification des cellules de recouvrement. Leur nombre est encore peu modifié, mais leur cytoplasme présente des signes de souffrance : vacuolisation et œdème. Les incisures séparant les anses capillaires sont comblées par cette réaction podocytaire. Les cellules capsulaires, de leur côté, sont peu modifiées soit dans leur épaisseur, soit dans leur nombre. Les lésions tubulaires sont peu marquées à notre échelle d'observation et ne sauraient avoir une valeur de diagnostic.

Tel est le tableau pathognomonique que nous pouvons tracer des glomérulonéphrites. Il diffère cependant notablement de celui que décrivent les auteurs ayant employé des coupes minces : Jones, Bohle, Churg et Grishman décrivent un œdème de l'espace péricapillaire, dissociant membrane basale capillaire et membrane basale épithéliale, formations pour nous hypothétiques. Dans cet œdème, se voient de nombreuses cellules dont la plupart sont *mononucléées* (c'est nous qui soulignons) et des fibrilles « membrane basal-like ». La comparaison de leurs clichés et de nos préparations nous semble indiquer qu'il s'agit d'une interprétation inexacte des images assez empâtées que donne la technique de Jones. Celle-ci entraîne un précipité argentique sur le matériel déposé entre les cellules, ayant des affinités tinctoriales analogues à celles de la basale. Ce dépôt sur le bord interne du cytoplasme turgescent dessinera la lumière capillaire en créant une apparence de basale vasculaire. Les noyaux des cellules endothéliales sont considérés de ce fait, comme appartenant à des éléments extracapillaires. Ainsi s'explique cet infiltrat inflammatoire, à prédominance mononucléaire, décrit dans l'espace péricapillaire.

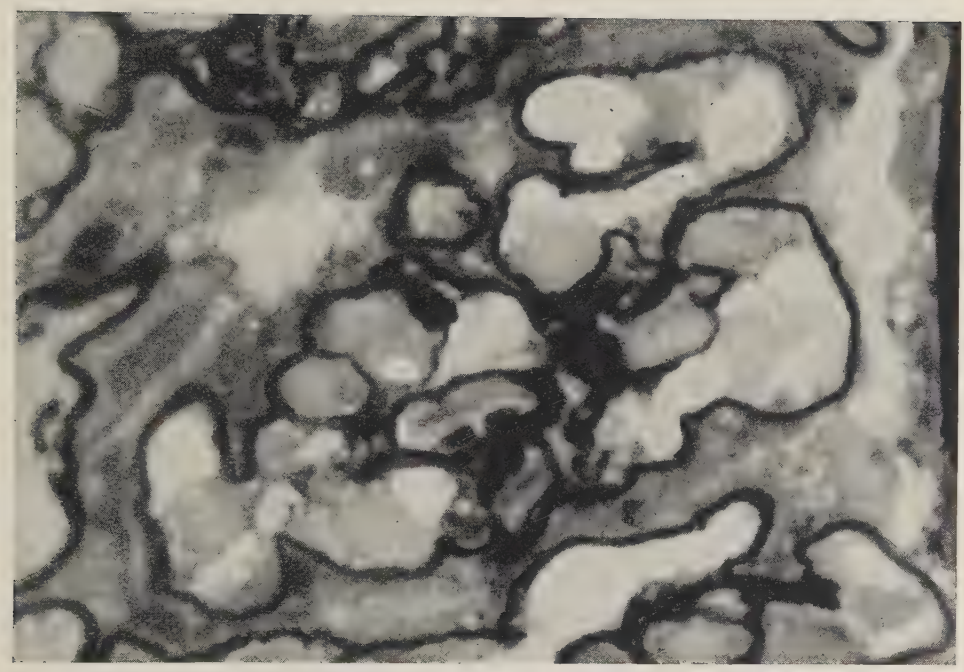


Fig. 5. — Endocapillarite obstructive ; turgescence des cellules endothéliales, disparition des éléments sanguins ; peut-être y a-t-il déjà des petites atteintes de la membrane glomérulaire. *Gross. : 100 × 45.*

Un second élément intervient aussi : la fixation par le formol ou par n'importe quel fixateur usuel ne préserve sûrement pas totalement le cytoplasme endothélial œdématié et plus fragile. Sa destruction contribue aussi à créer l'œdème péricapillaire ; ajoutons enfin l'origine presque exclusivement nécropsique du matériel étudié par les tenants de l'espace péri-capillaire. Il y a donc des causes d'erreur très probables dans la méthode employée par ces auteurs, et c'est là, croyons-nous, qu'il faut trouver la raison des divergences existant entre leurs descriptions et les nôtres, qui se rattachent étroitement à celles de la microscopie électronique. La fixation osmiée d'un prélèvement biopsique garantit la fidélité de nos images.

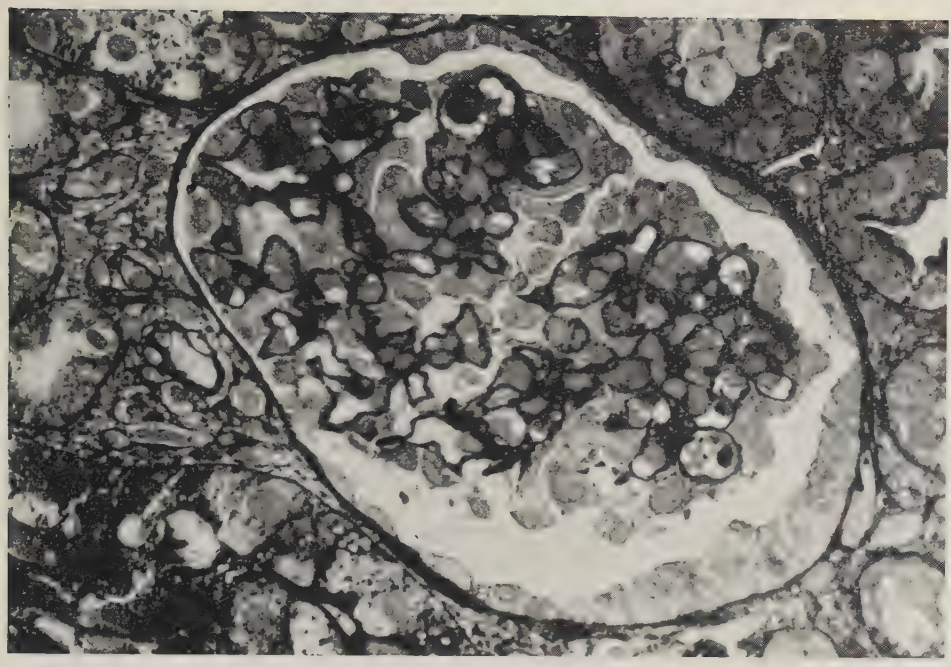
Enfin, nous n'avons jamais rencontré, à l'examen de glomérulonéphrites aiguës de l'enfant, d'aspects comparables à ceux que décrit Allen comme glomérulite exsudative. Cette invasion du glomérule par des polynucléaires se voit sans doute au cours des néphrites septico-pyohémiques, mais non dans les néphrites inflammatoires. Les clichés très nets de Jones (46) illustrant cette forme, sont tirés de l'étude d'une néphrite survenue au cours d'une septicémie à staphylocoques. On ne saurait généraliser à toutes les glomérulonéphrites aiguës, un processus lésionnel d'une étiologie aussi précise.

Pour nous, répétons-le, la lésion fondamentale de la glomérulonéphrite aiguë est l'endocapillarite proliférante et obstructive, accompagnée d'un œdème du reste du floculus. Elle constitue, avec l'atteinte podocytaire de la néphrose pure, la lésion initiale de toute glomérulopathie de l'enfant.

*
* *

Mais, l'une ou l'autre, réversibles, peuvent s'accompagner d'autres lésions, irréversibles, éléments de pronostic plus graves. Celles-ci frappent des éléments jusqu'ici indemnes : membrane glomérulaire et capsule de Bowman. Certaines sont décrites classiquement comme lésions caractéristiques des atteintes subaiguës. Nous pensons qu'il est plus prudent de les considérer comme des signes de glomérulosclérose, totale ou parcellaire.

Pour la clarté de notre exposé, nous conserverons la division schématique classique des glomérulosclérose en



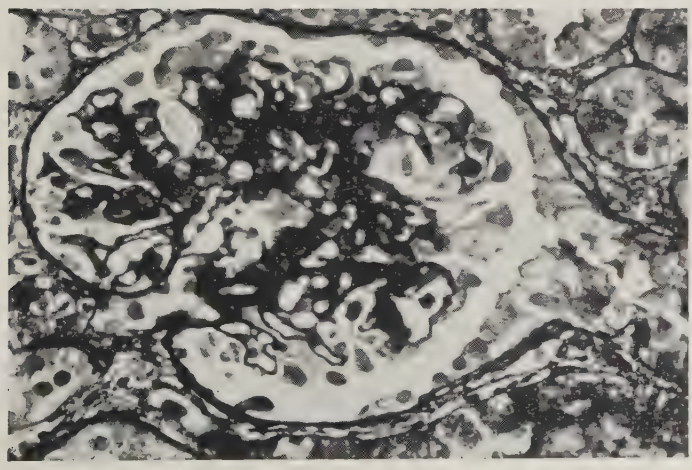


Fig. 6-7. — Glomérule de glomérulonéphrite subaiguë ; prolifération des cellules podocytaires séparant les lobules capillaires ; ceux-ci présentent une endocapillarite d'importance variable et une densification des espaces intercapillaires. Le croissant capsulaire, en bas et à droite, est un aspect normal comme le montre la comparaison des deux clichés représentant le même glomérule sur des coupes différentes ; le cliché 7 montre bien les pôles vasculaires et urinaires. *Gross. : fig. 6 : 40 × 27 ; fig. 7 : 40 × 19.*

atteinte intercapillaire : sclérose du floculus, et extracapillaire : prolifération capsulaire.

L'atteinte dite *intra-capillaire* est en réalité intercapillaire et membraneuse, les deux éléments réagissant le plus souvent ensemble. L'atteinte membraneuse est marquée par l'apparition des lésions que nous avons indiquées : irrégularité de dessin, épaississement plus ou moins diffus, contour festonné en sont les principales formes. Bien identifiées par la microscopie électronique, nous pouvons les retrouver sur nos préparations. Elles nous semblent plus marquées près de la tige glomérulaire où elles s'intriquent avec l'atteinte des espaces intercapillaires.

Ceux-ci sont augmentés de volume, bien visibles. Mais, tandis que, dans la glomérulonéphrite aiguë, ils sont œdématiés et présentent un contenu clair, ils sont, dans les glomérulosclérose, encombrés d'un matériel fibrillaire, entourant le noyau des cellules interstitielles. Cette densification, comme nous l'avons déjà signalé, rend très difficile le départ entre une prolifération ou une infiltration cellulaire de ces espaces, tout au moins dans les cas de néphropathies infantiles que nous avons examinés. Nous ne pouvons donc souscrire entièrement à l'opinion de Churg et Grishman (38) qui font de l'hypercellularité mésangiale un facteur prépondérant de la glomérulosclérose.

Parallèlement à ces lésions du floculus, qui, rappelons-le, superposées à l'atteinte initiale, podocytaire ou endothéliale, sont les plus précoces et les plus constantes, évoluent les lésions *extra-capillaires*.

Classiquement, elles sont surtout capsulaires. La prolifération cellulaire forme le croissant épithélial, bien connu ; il se traduit sur nos coupes par un amas de cellules, à protoplasme d'abord mal limité, puis séparées par une substance se colorant comme la membrane basale. Le feuillet capsulaire de cette dernière réagit parallèlement, en présentant des épaisissements irréguliers et parfois un aspect stratifié ; ces réactions capsulaires seront, soit diffuses, soit plus souvent localisées à une portion de la chambre glomérulaire.

Nous voudrions souligner un point qui n'apparaît pas avec évidence sur les préparation de routine. La prolifération des cellules capsulaires s'accompagne toujours, d'après notre expérience, d'une prolifération podocytaire : on trouve sur une anse à membrane épaissie, une multiplica-

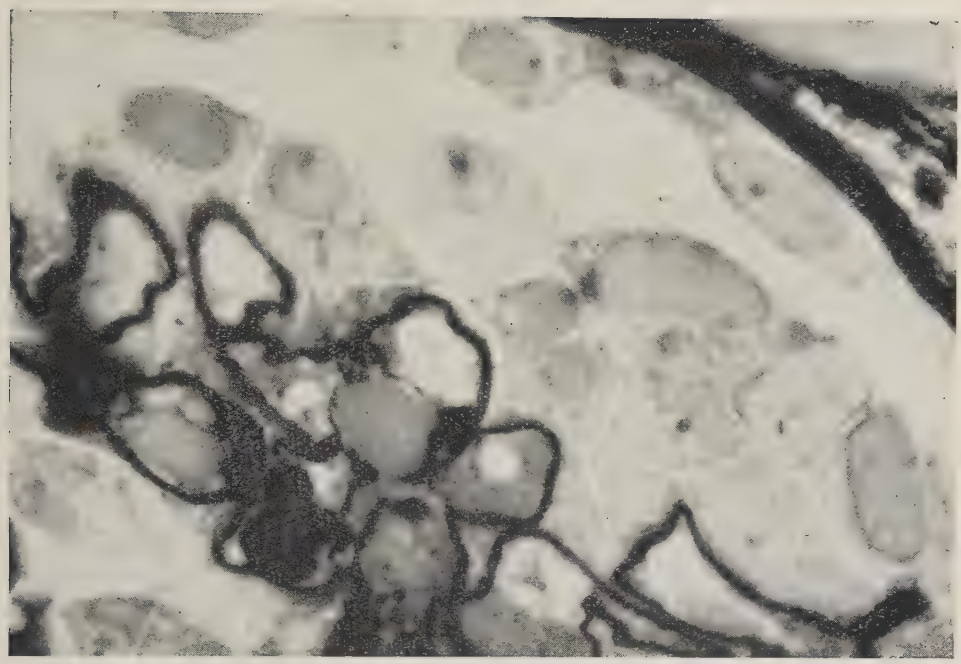


Fig. 8. — Prolifération des cellules de recouvrement au cours d'une glomérulite subaiguë ; en haut et à droite, la capsule de Bowman ; en bas, un élément du floculus à disposition en trèfle, présente déjà quelques irrégularités de structure. *Gross. : 100 × 45*

*

tion des cellules de recouvrement, en amas, sans structure propre. Cette modification s'observe aussi dans les incisures glomérulaires et amène une séparation plus marquée des anses capillaires.

Ainsi la formation d'une nappe cellulaire continue de la capsule jusqu'au floculus est attribuable à une réaction commune de l'élément proprement urinaire du glomérule ; ceci nous explique la localisation de ce processus en regard d'anses ou de lobules à membrane et à endothélium modifiés. Secondairement, l'involution des cellules créera une synéchie fibreuse.

Nous n'avons pas constaté de prépondérance de la sclérose intercapillaire ; de même, sa forme mineure entraînant une lobulation du glomérule ne nous paraît pas fréquente ; peut-être s'agit-il là d'évolution d'affections initialement vasculaires plus rares chez l'enfant.

Ainsi la glomérulosclérose met-elle en jeu une prolifération cellulaire de tous les constituants du glomérule, associée à l'apparition d'une substance se colorant comme la membrane basale. Nous ne pouvons affirmer qu'il s'agisse d'une sclérose « stricto sensu » car la microscopie électronique n'a pas établi de façon indiscutable la présence de collagène, à la périodicité caractéristique, dans ce matériel, pas plus d'ailleurs que dans les épaississements de la membrane basale.

Indiquons pour terminer notre description, les différentes formes que peut revêtir finalement cette glomérulosclérose :

Elle peut être discrète, caractérisée par l'apparition d'un croissant fibreux capsulaire et d'une sclérose de l'espace intercapillaire. L'irrigation et donc la physiologie du floculus sont peu modifiées.

Un degré plus important est réalisé par l'amputation d'une partie du glomérule, dont on retrouve la membrane, noyée dans la prolifération épithéliale.

Le terme ultime est le classique pain à cacheter. La métachromasie provoquée nous permet d'y retrouver le squelette du floculus. Tantôt il est rétracté, épaissi, avec un plissement prononcé des membranes et n'occupe plus qu'une partie réduite de la chambre urinaire comblée par la prolifération des éléments de recouvrement et le matériel qui les entoure. Tantôt au contraire, la situation des mem-

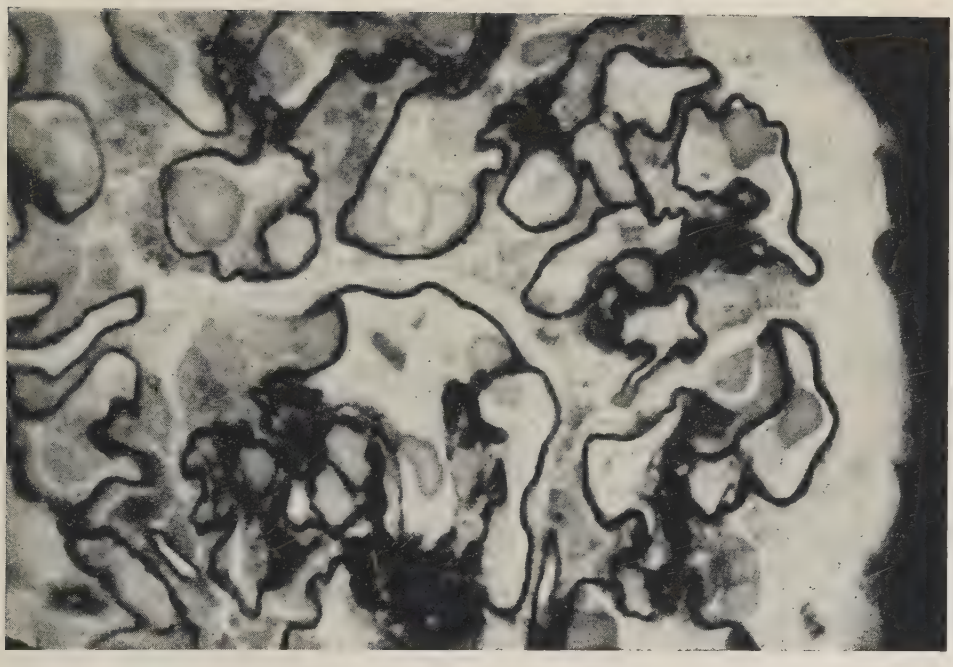


Fig. 9. — Glomérule en voie de sclérose : atteinte irrégulière de la membrane glomérulaire ; en bas, condensation des espaces intercapillaires ; en haut et à gauche, inclusions hyalines dans un podocyte ; à droite, la capsule de Bowman ; il n'existe pas de signes d'évolutivité dans ce glomérule.. *Gross. : 100 × 27.*

branes glomérulaires est peu modifiée ; elles persistent dans toute l'étendue du glomérule et renferment des éléments cellulaires alignés dans les anses, sans les déformer ou leur donner une structure lobulaire. Parallèlement à ces cellules « endo-murales » dont nous ne pouvons préciser l'origine endothéliale ou mésangiale, des cellules « extra-murales » séparent les anses, empêchant leur fusion ou leur rétraction et se continuent avec la prolifération circulaire de la capsule.

Deux hypothèses peuvent expliquer cette disposition terminale variable.

Dans l'une, il peut s'agir d'une succession chronologique d'étapes lésionnelles, le rabougrissement de la touffe glomérulaire se produisant secondairement, sous l'effet d'une sclérose extensive. Le facteur essentiel serait ici le facteur temps.

Dans l'autre, entre en jeu l'importance respective de la prolifération endomurale et de la prolifération extramurale : si la multiplication des cellules de revêtement est prépondérante, elle refoulera le floculus ; par contre, une multiplication équilibrée respectera la disposition générale du glomérule. Il serait tentant de considérer la glomérulosclérose intercapillaire comme dûe à la prépondérance de la multiplication endomurale, mais, comme nous l'avons dit, nous ne l'avons pas observée. On ne peut préciser si cette variabilité de réaction traduit une évolutivité ou une étiologie différente ; cela ne saurait être affirmé que par l'étude de prélèvements plus importants que les nôtres.

Enfin, dans le tableau de la néphrite chronique, la sclérose glomérulaire s'acocmpagnera de réaction interstitielle et de lésions tubulaires : dégénérescence cellulaire, ectasie tubulaire, présence de cylindres, atteinte des basales. Toutes ces lésions sont bien connues et évidentes, même sur coupes épaisses. Elles permettent d'affirmer l'atteinte de tout l'organe et sont donc des éléments de pronostic sombre.

*
* *

Notre étude sur la sclérose glomérulaire dans ses diverses formes a volontairement omis les corrélations anatomo-cliniques. En effet, à notre avis, seules les lésions initiales

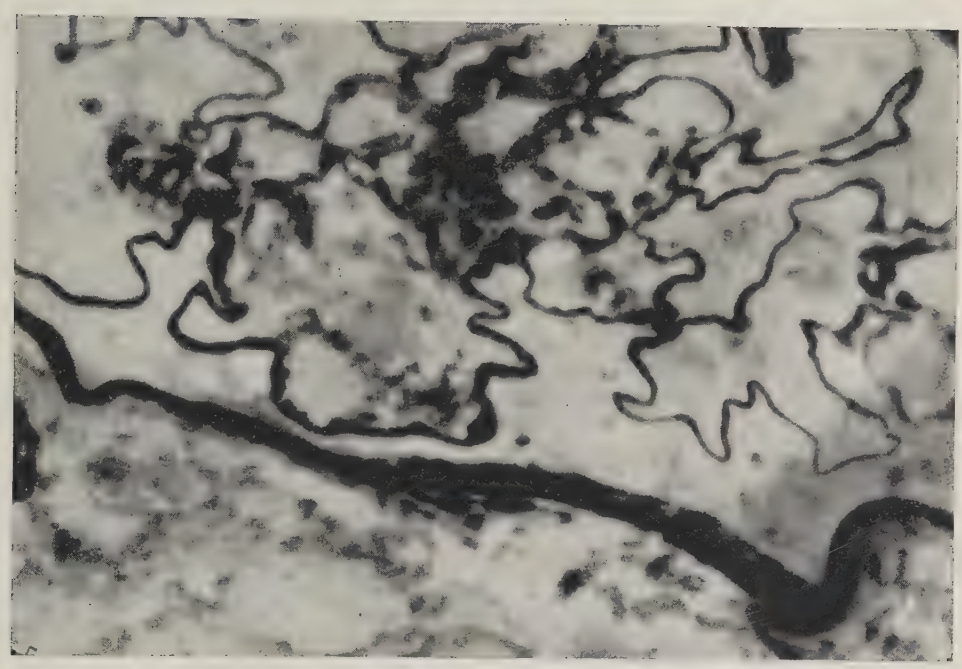


Fig. 10. — Atteinte de la membrane glomérulaire au cours d'une glomérulite subaiguë : épines sur le versant endothélial (comparer avec la figure 11) ; dépôts « membrane-like » dans un espace intercapillaire ; la coupe de 0,2 µ ne montre pas sel détails cellulaires. *Gross. : 100 × 45.*

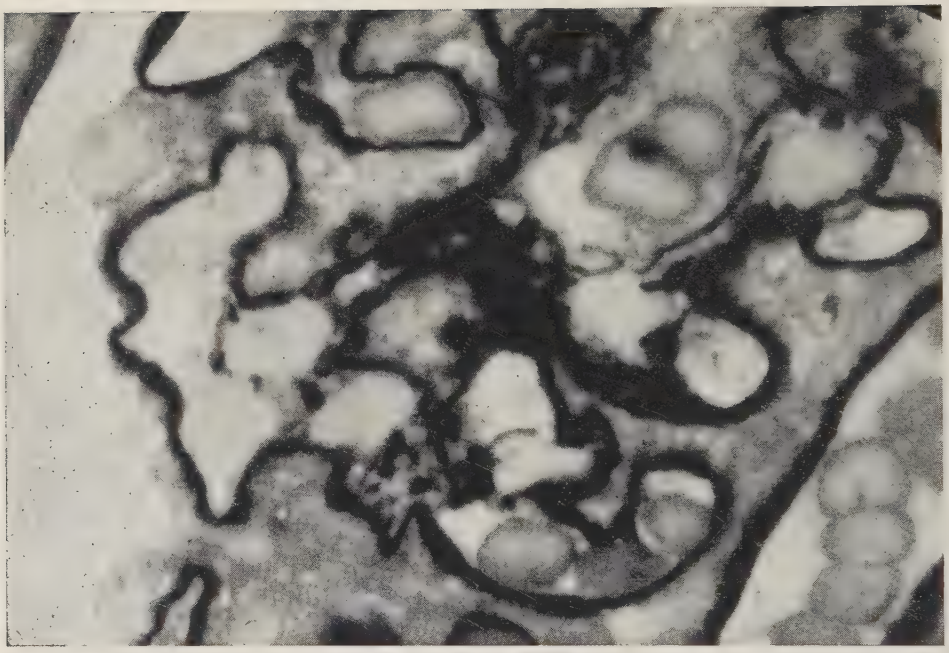


Fig. 11. — Glomérulite subaiguë avec un syndrome néphrotique du type « adulte » ; altérations de la membrane glomérulaire sur son versant *externe* ; elles sont très nettes en haut à gauche et en bas à droite ; il existe au milieu, à gauche une irrégularité de colorabilité rappelant l'aspect décrit par JONES dans la glomérulite membraneuse. *Gross. : 100 × 45.*

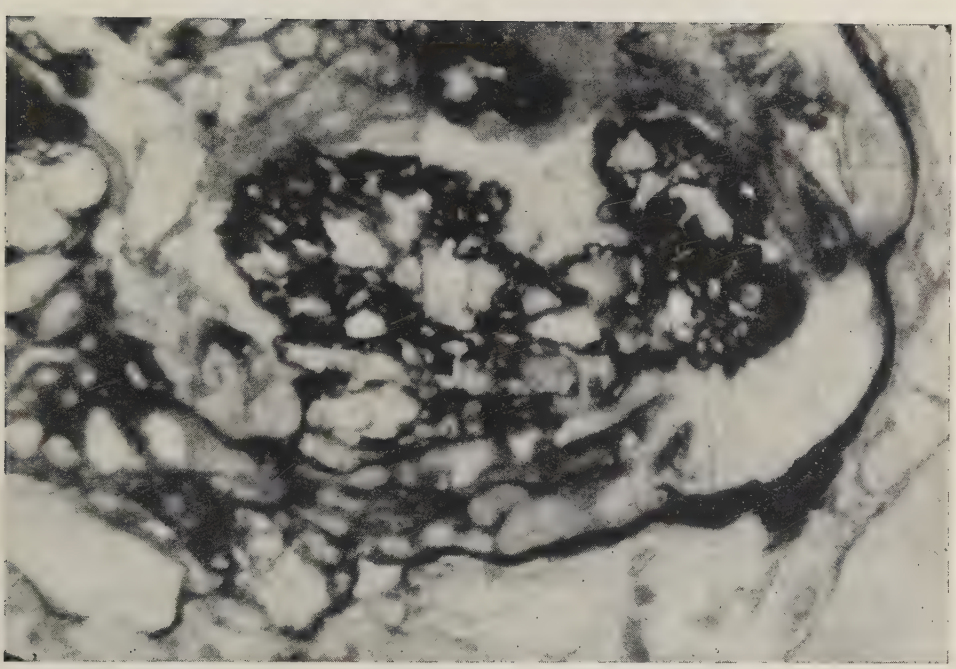


Fig. 12. — Glomérulosclérose à prédominance extra-murale ; noter le tassement des membranes du floculus et leur aspect ondulé ; dans la prolifération des cellules capsulaires, apparition intercellulaire d'une substance se colorant comme la basale ; il ne s'agit pas d'une néphropathie ascendante, mais bien d'une glomérulite subaiguë évoluant en deux ans. *Gross. : 50 × 45.*

des glomérulopathies peuvent être rattachées à un cadre clinique précis. Leur extension à tout le glomérule, réalisant les divers aspects étudiés sous le terme générique de glomérulosclérose, est éminemment variable : variable suivant le point examiné — discrète ici, considérable là — variable dans son évolutivité, car nous ne pensons pas qu'une atteinte initialement discrète : densification de l'espace intercapillaire, apparition d'épines sur le versant endothélial de la membrane glomérulaire, doive fatalement amener la formation d'un pain à cacheter.

Le tableau clinique représente la somme des atteintes de chaque glomérule, évoluant chacun de façon propre.

Le diagnostic d'évolutivité ne sera porté que sur la coexistence de lésions différentes dans des glomérules voisins : si l'un présente une endocapillarite marquée alors que l'autre est le siège d'un croissant épithélial et qu'un troisième est fibreux, on pourra parler de glomérulonéphrite subaiguë.

La présence d'un pain à cacheter n'a, isolément, aucune valeur ; c'est sa fréquence, associée à des lésions interstitielles et tubulaires qui fera porter le diagnostic de glomérulonéphrite chronique.

La précision du diagnostic sera donc fonction du nombre de glomérules examinés. Une ponction biopsie en ramène une vingtaine dont l'examen donnera des conclusions valables s'il s'agit d'une néphropathie diffuse et il est certain que l'histologie classique permet cet examen beaucoup plus aisément que les procédés exigeant une fragmentation du matériel, comme la microscopie électronique ou notre méthode d'examen sur coupes minces.

Est-ce à dire que ces méthodes, plus précises, sont inutiles ? Nous ne le pensons pas.

D'une part, on doit toujours ramener leurs conclusions au contexte clinique. Si elles indiquent des lésions récentes, alors que cliniquement l'atteinte rénale est ancienne, on peut en déduire la poursuite à bas bruit du processus morbide. Elles sont plus capables que l'histologie classique de faire un bilan exact des lésions ; ceci ne vaudra que si elles permettent des conclusions positives.

D'autre part, certaines modalités de glomérulosclérose ont une valeur d'orientation assez grande : une endocapillarite s'accompagnant de lésions diffuses de la membrane

glomérulaire, surtout d'un dépôt sur son versant urinaire, sera très probablement le signe d'un syndrome néphrotique secondaire à une glomérulonéphrite. Mais cette atteinte particulière serait le propre, plutôt, des néphroses de l'adulte.

De même, il nous semble, après examen des néphrites du syndrome de Schönlein-Hénoch, que cette variété de glomérulo-néphrite se caractérise par une atteinte localisée et précoce de la membrane glomérulaire, sans signe d'évolutivité, ni réaction de la capsule de Bowman ; ceci rejoint les conclusions de travaux antérieurs basés sur les mêmes prélèvements (17).

Enfin, nous pensons que le type prépondérant de sclérose : intercapillaire ou capsulaire, doit avoir une signification à rechercher par l'accumulation de documents anatomo-cliniques, pour préciser, selon l'aphorisme de Laënnec, la lésion se faisant.

Commentaires

L'étude de l'anatomie pathologique des néphropathies que nous avons examinées, nous paraît mériter quelques commentaires.

Rappelons d'abord les limites de notre étude : elle n'a porté que sur des cas de néphrose pure, de néphrose mixte, de glomérulonéphrites aiguës, subaiguës et chroniques de l'enfant. Il n'y avait donc aucune néphropathie de surcharge : amylose, diabète ; aucune néphropathie vasculaire : collagénose, artériosclérose. A cette limitation est liée, sans doute, l'absence d'atteinte isolée de la membrane glomérulaire et de néphrite lobulaire. Nous ne pouvons donc préciser l'histologie fine de telles atteintes. Mais, dans les limites de notre expérience, nous croyons sommaire de considérer l'atteinte de la membrane comme l'élément principal essentiel et primordial de toute néphrite. Cette atteinte, peut-être facile à examiner en microscopie électronique, traduit l'extension du processus morbide à tout le floculus. De même que l'embryogénèse montre le développement de la membrane basale sous l'induction des deux catégories cellulaires qu'elle sépare, de même ses modifications pathologiques seront secondaires à une lésion antérieure, podocytaire ou endothéliale.

Il se peut que, chez l'adulte, elle réagisse aux atteintes vasculaires, mais il serait paradoxal que soit supprimée, dans ces cas, la lésion endothéliale.

Nous avons montré la coexistence très fréquente d'une atteinte parallèle de la membrane glomérulaire et des espaces intercapillaires. La pathologie de ceux-ci n'a peut-être pas l'importance que lui donnent Jones ou Churg et Grishman, mais leurs lésions sont cependant réelles, précoces, souvent irréversibles. Nous n'avons pu préciser s'il s'agit d'une réaction globale du mésangium, inclusion de tissu interstitiel dans le floculus, en continuité au niveau du pôle vasculaire avec celui du rein, ou plus probablement d'un phénomène local, prêtant moins aux spéculations pathogéniques.

Nous n'avons jamais trouvé d'images d'espace péricapillaire ; celui-ci est réalisé par un artefact de coloration argentique, mais n'a pas d'existence propre.

L'évolution générale des glomérulopathies de l'enfant se fait suivant le schéma général de l'inflammation, au moins partiellement :

L'endocapillarite de la glomérulite aiguë est une lésion semblable à celle que l'on retrouve dans de nombreux phénomènes inflammatoires, hyper-ergiques ou de sensibilisation. On peut simplement l'étudier avec plus de précision par suite de la disposition anatomique du floculus capillaire.

La prolifération des cellules de revêtement, leur fibrose, rappellent étroitement les réactions des séreuses, de même origine mésenchymateuse ; elles méritent d'avantage l'épithète de mésothéliales, que celle d'épithéliales.

Par contre, d'autres points sont encore obscurs :

L'atteinte podocytaire de la néphrose pure, sa cause, ses rapports avec la protéinurie n'ont rien de comparable dans le reste de l'organisme.

La liaison existant entre lésion podocytaire ou endothéliale et sclérose glomérulaire est peu nette ; aucun signe histologique ne permet de la saisir ni de prévoir la progression de la sclérose. Elle semble avoir comme étape indispensable une modification de la membrane glomérulaire et le dépôt, d'abord dans les espaces intercapillaires,

puis entre les cellules de recouvrement, du matériel que nous avons toujours défini par sa ressemblance avec la membrane basale : histologiquement et électroniquement, il a le même aspect. Reste le problème de sa nature exacte : on ne saurait le considérer comme un élément fibreux, collagénique, car il ne présente pas de périodicité reconnaissable. Cependant, c'est par un tel matériel que s'effectue initialement la sclérose glomérulaire. Il apparaît entre les cellules de la capsule et ne semble pas d'origine sanguine, ce qui permettrait d'en faire de la fibrine. Il y a là, en séquelle de l'inflammation glomérulaire, un phénomène plus proche de la hyalinose que de la collagénisation ; celle-ci est beaucoup plus tardive. Nous retrouvons ainsi, sous un aspect particulier, un des problèmes posés par la substance fondamentale, ses variations pathologiques et ses rapports avec les fibres collagéniques. Si nous pensons par ailleurs à ce que nous définissons comme sénescence, il est logique d'en déduire une réactivité particulière du tissu conjonctif infantile ; ceci fait des néphropathies de l'enfant un chapitre intéressant la pathologie générale autant que l'anatomie pathologique spéciale.

Ainsi l'examen que nous avons mené, par les précisions qu'il a fournies, permet d'aborder quelques-uns des problèmes les plus actuels de la pathologie. La poursuite de cette étude permettra, nous l'espérons, des progrès dans la connaissance des néphropathies de l'enfant, et donc dans l'établissement de leur pronostic et le choix d'une thérapeutique.

CONCLUSIONS

L'emploi pour la microscopie optique de fragments de tissu rénal prélevés par ponction-biopsie et préparés pour un examen en microscopie électronique est possible.

Une conservation morphologique parfaite est ainsi assurée ; de plus, les coupes très fines qui peuvent être obtenues permettent un recherche très détaillée.

L'étude critique des diverses étapes de la préparation du prélèvement, doit faire faire des réserves sur la validité des résultats obtenus grâce aux méthodes histologiques ou histochimiques habituelles.

De nouvelles techniques de coloration sont proposées.

Appliquées au néphropathies de l'enfant, elles nous ont permis de vérifier l'existence de cellules intercapillaires, mais l'absence d'espace péricapillaire, dans des conditions normales ou pathologiques.

Les divergences existant entre les conclusions des examens électrono-microscopiques, et celles de certaines études utilisant des coupes minces sont attribuées à des artefacts.

D'une comparaison entre les données de l'histologie classique, de l'histologie sur coupes minces, et de la microscopie électronique, peut s'esquisser un essai d'interprétation générale des néphropathies de l'enfant.

Vu : *Le Président de thèse,*
M. Sendrail.

Vu : *Le Doyen,*
Pour le Doyen :
l'Assesseur : R. Delas.

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 8 juin 1961.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université :
Dottin.

BIBLIOGRAPHIE

On trouvera dans la thèse de RÉGNIER (73) une bibliographie plus complète des travaux récents de néphrologie. Seuls sont signalés ici ceux en rapport avec notre technique ou nos constatations.

1. ADAMS C. W. M. — Histochemical mecanism of the Marchi reaction for degenerating myelin ; *J. Neurochem., 2,* 178-186, 1958.
2. ADAMS C. W. M. — A histochemical method for simultaneous demonstration of normal and degenerating myelin ; *J. Path. and Bact.,* 77, 648- 649, 1959.
3. ADAMS C. W. M. — Osmium tetroxide and the Marchi method : reactions with polar an non-polar lipids, proteins and polysaccharids, *J. Histochem. Cytochem., 8,* 262-268, 1960.
4. ALLEN A. C. — The kidney (medical and surgical diseases), London, *Churchill,* 1951.
5. BAHR G. F. — Osmium tetroxide and Ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances. Electron stains III ; *Exp. cell Res., 7,* 457-479, 1954.
6. BAHR G. F. — Continued studies about fixation with osmium tetroxide. Electron stains, IV ; *Exp. cell Res., 9,* 277-285, 1955.
7. BAHR G. F. — Zur Interpretation elektronenmikroskopischer Bilder osmiumfixierter Objekte ; *Naturwiss, 42,* 121, 1955.
8. BAHR G. F. — Der Osmiumgehalt fixierter Speicheldrüsenzellen von Chironomus ; *Z. Naturforsch. 11 b,* 59-60, 1956.
9. BAHR G. F., BLOOM G., FRIBERG U. — Problems of osmium fixation. Electron microscopy proceed. of the Stockholm conf. Stockholm. *Almqvist & Wiksell,* 1957, pp. 106-107.
10. BAKER J. R. — Principles of biological microtechnique ; London, *Methuen & C°,* 1958.
11. BAKER J. R. — Fixation in Cytochemistry and Electron microscopy ; *J. Histochem. Cytochem. 6,* 303-309 ; 1958.
12. BARRNETT R. J., PALADE G. E. — Applications of histochemistry to Electron microscopy ; *J. Histochem. Cytochem. 6,* 1-12, 1958.
13. BARRNETT R. J., ROTH W. D. — Effects of fixation on protein histochemistry ; *J. Histochem. Cytochem. 6,* 406-415, 1958.

14. Bencosme S. A., Stone R. S., Latta H., Madden S. C. — A rapid method for localization of tissue structures or lesions for electron microscopy ; *J. Biophys. Biochem. cytol. 5*, 508-509, 1959.

15. Bohle A., Kreke H. J. — Zur Frage der Basalmembranen der Glomerulusschlingen der Niere des Menschen ; *Virchow Arch. 327*, 663-696, 1955.

16. Bohle A., Herfart C. — Zur Frage eines intercapillären Bindegewebes in Glomerulum der Niere des Menschen ; *Virchow Arch. 331*, 573-590, 1958.

17. Bouissou H., Dupont H. C., Régnier C. — Les lésions rénales du syndrome de Schönlein-Hénoch chez l'enfant ; *Ann. anat. path. 5*, 258-281, 1960.

18. Bouissou H., Régnier C. — L'insuffisance rénale aiguë de l'enfant ; *Arch. franç. de Péd. 17*, 1194-2003, 1960.

19. Bouissou H., Régnier C. — Le syndrome néphrotique en apparence primitif de l'enfant : étude histologique et électronique ; *Ann. Anat. Path. 5*, 363-390, 1960.

20. Boyer C. C. — The vascular pattern of the renal glomerulus as revealed by plastic reconstruction from serial sections. *Anat. Rec. 125*, 433, 1956.

21. Caulfield J. B. — Effects of varying the vehicle for OsO_4 in tissue fixation ; *J. Biophys. Biochem. Cytol. 3*, 827-830, 1957.

22. Chou J. T. X. — Experiments on the fixation of lipids by osmium tetroxide ; *Quart. J. Micr. Sci. 99*, 285-287, 1958.

23. Churg J., Grishman E. — Phase microscope studies of renal glomeruli ; *Amer. J. Path. 29*, 199-216, 1953.

24. Churg J., Grishman E. — Application of thin sections to the problems of renal pathology ; *J. Mt Sinaï Hosp. 24*, 736-744, 1957.

25. Churg J., Grishman E. — Subacute glomerulonephritis ; *Amer. J. Path. 35*, 25-45, 1959.

26. Clara M. — Anatomie und Biologie des Blutkreislaufs in der Niere ; *Arch. für Kreislaufforsch. 3*, 42-94, 1938.

27. Claude A. — Problems of fixation for Electron microscopy ; *Pathologie et Biologie, 9*, 933-947, 1961.

28. Combes P. F. — La glomérulose diabétique ; *thèse Toulouse* 1960.

29. Criegee R. — Osmiumsaüre-ester als Zwischenprodukte bei Oxydationen ; *Liebigs Ann. Chem. 522*, 75-96, 1936.

30. Criegee R., Marchand B., Wannowius H. — Zur Kenntnis der organischen Osmiumverbindungen. II Mitteilung ; *Liebigs Ann. Chem. 550*, 99-133, 1941.

31. Dallam D. R. Determination of protein and lipid lost during osmic acid fixation of tissues and cellular particulates ; *J. Histochem. Cytochem. 5*, 178-181, 1957.

32. Danon D. Etude comparative des techniques histologiques pour le microscope électronique par la méthode des coupes minces. *Thèse Genève*, 1952.

33. Ehrlich P. Enzyklopädie der Mikroskopischen Technik ; Berlin, *Urban & Schwarzenberg*, 1910.

34. Elftmann H. — Osmichrome fixation ; *Quart. J. Micr. Sc. 98*, 15-18, 1957.

35. Gibbons Jr, Bradfield J. R. G. — The fixation of cells nuclei by osmium tetroxide ; *Biophys. Biochem. Acta 22*, 506,-513, 1956.

36. Goormaghtigh N. — Le mesangium du floculus glomérulaire. Ses réactions dans la glomérulite aiguë et les néphrites hypertensives ; *J. d'urol. 57*, 569-585, 1951.

37. Grishman E., Churg J. — Acute glomerulonephritis ; a histopathological study by means of thin sections ; *Amer. J. Path. 33*, 993-1007, 1957.

38. Grishman E., Churg J. — Chronic glomerulonephritis ; *Amer. J. Path. 36*, 607-621, 1960.

39. Harkin J. C., Recant L. — Pathogenesis of experimental nephrosis. Electron microscopic observations ; *Amer. J. Path. 36*, 303-331, 1960.

40. de Harven E. — A propos de l'application de certaines colorations histologiques à des tissus fixés par l'acide osmique tamponné et inclus dans le méthacrylate de butyle ; *C.R. Soc. de Biol. 150*, 63-65, 1956.

41. Hofmann K. A. — Sauerstoffübertragung durch Osmiumtetroxyd und Aktivierung von Chloratlösungen ; *Ber. deut. Chem. Ges. 45*, 3329-3336, 1912.

42. Hofmann K. A., Ehrart O., Schneider O. — Aktivierung von Chloratlösungen durch Osmium. II Mitteilung ; *Ber. deut. Chem. Ges. 46*, 1657-1668, 1913.

43. Houk C. E., Dempsey E. W. — Cytological staining procedures applicable to methacrylate embedded tissues ; *Stain Technol. 29*, 207-211, 1954.

44. Jenning B. M., Farquhar M. J., Moon H. D. — Staining methods for osmium methacrylate sections ; *Amer. J. Path. 35*, 991-997, 1959.

45. Jones D. B. — Inflammation and repair of the glomerulus ; *Amer. J. Path. 27*, 991-1009, 1951.

46. Jones D. B. — Glomerulonephritis ; *Amer. J. Path. 29*, 33-51, 1953.

47. Jones D. B. — Nephrotic glomerulonephritis ; *Amer. J. Path. 33*, 313-329, 1957.

48. Keigler N. M., Smith A. C. — Cytological observations of the effect of enzymes on Acid treated spores of Bacillus cereus ; *J. Histochem. Cytochem. 2*, 233-247, 1954.

49. Kramer M., Windrum G. M. — Sulphation techniques in histochemistry with special reference to metachromasia ; *J. Histochem. Cytochem. 2*, 196-208, 1954.

50. Lacy P. E. — Electron microscopic identification of different cell types in the islets of Langerhans of the guinea pig, rat, rabbit, and dog ; *Anat. Rec. 128*, 255-267, 1957.

51. Lazorthes-Herland. *Thèse Toulouse*, 1961 (à paraître).

52. Lee A. B., Henneguy L. F. — Traité des méthodes techniques de l'anatomie microscopique ; *Doin*, Paris, 1896.

53. Leuchtenberger C., Doolin P. F., Kutsakis A. H. — Buffered osmium tetroxide fixation for cytologic and Feulgen microspectrophotometric studies of human rectal polype. *J. Biophys. Biochem. cytol. 1*, 385-390, 1955.

54. Low F. N. — The electron microscopy of sectionned lung tissue after varied duration of fixation in buffered osmium tetroxide. *Anat. Rec. 120*, 827, 1954.

55. Mc Callum W. G. — Glomerular changes in nephritis ; *Bull. Johns Hopkins Hosp. 55*, 416-432, 1934.

56. Mc Manus J. F. A., Mowry R. W. — Effects of fixation on carbohydrate chemistry. *J. Histochem. cytochem. 6*, 309-316, 1958.

57. Mc Manus J. F. A., Kurtz S. — Two types of « endothelial » cells in the human glomerulus (Abstract). *Amer. J. Path. 35*, 706, 1959.

58. Menke W. — Artefakte in elektronenmikroskopischen Präparate. *Z. für Naturforsch. 12* b, 654-660, 1957.

59. Merriam R W. — The contribution of lower oxides of osmium of the density of Biological Specimens in Electron Microscopy. *J. Biophys. and Biochem. cytol. 4*, 579-582, 1958.

60. Monteil C. — Etiopathologie des anuries chez l'enfant. *Thèse Toulouse*, 1961.

61. Moore R. Q., Mumaw V., Schoenberg M. — Optical microscopy of ultra thin sections. *J. Ultrastructure Research. 4*, 113-116, 1960.

62. Moses M. J. — Studies of nuclei using correlated cytochemical, light and electron microscope technique. *J. Bioph. Biochem. Cytol. 2* (suppl.), 397-406, 1956.

63. Mowry R. W. — Observations on the use of sulfuric acid in Ether for the sulfation of hydroxyl groups in tissues section ; *J. Histochem. Cytochem. 6*, 82-83, 1958.

64. Oberling C. — Morphologie et physiologie des néphrites. *Ann. Anat. path. 1*, 217-298, 1924.

65. Oberling C. — L'existence d'une housse neuro-musculaire au niveau des artères glomérulaires de l'homme. *C. R. Académie Sciences Paris, 184*, 1200-1202, 1927.

66. Oberling C., Hatt P. Y. — Etude de l'appareil juxtaglomérulaire du rat au microscope électronique. *Ann. Anat. Path. 5*, 441-474, 1960.

67. Ornstein L., Pollister A. W. — Applications of Phase microscopy in cytology and electron micrography ; *Trans. New-York Acad. Science*, Série II, *14*, 194-199, 1952.

68. Palade G. E. — A study of fixation for electron microscopy. *J. Exper. Med. 95*, 285-298, 1952.

69. Partington J. R., Huntingford D. B. — The reduction of osmic acid by lipoïds. *J. Roy. Micr. Soc.*, pp. 15-19, 1921 (sans tomaison).

70. Porter K. R., Kallman F. — The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. *Exp. Cell. Res. 4*, 127-141, 1953.

71. Putois J. — La ponction biopsie du rein. Structure et ultrastructure du rein normal et pathologique. *Thèse Toulouse*, 1959.

72. Rathery. — Le tube contourné du rein (étude histologique, anatomopathologique, expérimentale). *Thèse Paris*, 1905.

73. Régnier C. — Etude histologique et électronique du rein normal et pathologique de l'enfant. *Thèse Toulouse*, 1959.

74. Rhodin J. — Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. *Thèse Stockholm*, 1954.

75. Ruff O., Rathsburg H. — Uber das Osmiumdioxyd. *Ber. deut. Chem. Ges. 50*, 484-498, 1917.

76. Runge W. J., Vernier R. L., Hartmann J. F. — A staining method for sections of osmium fixed methacrylate embedded tissue. *J. Biophys. Biochem. Cytol. 4*, 327-328, 1958.

77. Ruyter J. H. C. — Uber einen merkwürdigen Abschnitt der Vasa afferentia in der Maüseniere. *Z. Zelleforsch. 2*, 242-248, 1925.

78. Satir P. G., Peachey L. D. — Thin section II. A simple method for reducing compression artefacts. *J. Biophys. Biochem. Cytol. 4*, 345-347, 1958.

79. Stoekenius W. — Polymethacrylateinbettung und Dünnschnitteknik in der Lichtmikroskopie. *Zsch. wiss. Mikr. 63*, 210-215, 1957.

80. Van Breemen V. L., Neustein H. B., Bruns P. D. — Pulmonary hyaline membranes studied with the electron microscope. *Amer. J. Path. 33*, 769-790, 1957.

81. Vimtrup B. — On the number, shape, structure and surface area of the glomeruli in the kidney of man and mammals. *Amer. J. Anat. 41*, 123, 1928.

82. VOLHARD F., FAHR T. — Die Bright'sche Nierenkrankheit. *Springer Verlag.* 1914.

83. WIGGLESWORTH U. B. — The use of osmium in the fixation and staining of tissues. *Proc. Roy. Soc.*, ser. B, Biol. Sc. London *147*, 185-199, 1957.

84. WOLMAN M. — Problems of fixation in cytology, histology, and histochemistry. *Intern. Rev. Cytol. 4*, 79-114, 1955.

85. WOLMAN M. — The reaction of osmium tetroxide with tissue components. *Exp. Cell Res. 12*, 231-240, 1957.

86. ZIMMERMANN K. W. — Uber den Bau des Glomerulus der menschlichen Niere. *Ztschr. f. mikr. anat. Forsch. 18*, 520-522, 1929.

87. ZIMMERMANN K. W. — Uber den Bau des Glomerulus der Saügeniere. *Ztschr. f. mikr. anat. Forsch. 32*, 176-278, 1933.

88. ZOLLINGER H. U. — Untersuchungen an Nierenpunktaten : Phasenmikroskopie am Dünnschnitt. *Schweitz. Z. Allg. Path. Bakt. 20*, 42-46, 1957.

Ateliers professionnels et d'apprentissage de l'Orphelinat Saint-Jean, Albi